

Aus der Klinik für Innere Medizin
Schwerpunkt Pneumologie
Direktor: Prof. Dr. med. Claus Vogelmeier
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Atemwegsmuzine bei Mukoviszidose im Verlauf einer bronchopulmonalen Exazerbation



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Michèle Germann

aus Kirchheimbolanden

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
27.09.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. C. Vogelmeier

1. Korreferent: PD Dr. M. Zemlin

Für Ina und Peter

1	EINLEITUNG	- 10 -
1.1	MUKOVISZIDOSE	- 10 -
1.1.1	Allgemeines	- 10 -
1.1.2	Klinik	- 10 -
1.1.3	Diagnostik	- 13 -
1.1.3.1	Pilocarpin- Iontophorese- Schweißtest	- 13 -
1.1.3.2	Transepitheliale Potenzialdifferenz	- 13 -
1.1.3.3	Mutationsanalyse	- 13 -
1.1.4	CFTR (ein Chloridkanal)	- 15 -
1.1.4.1	Molekulare Pathogenese	- 15 -
1.1.4.2	Ionenströmungen in der Zelle	- 17 -
1.2	MUKUS	- 17 -
1.3	SPUTUM	- 18 -
1.3.1	Zusammenfassung der CF-Pathophysiologie	- 19 -
1.4	MUZINE, EIN BESTANDTEIL DES MUKUS	- 20 -
1.4.1	Allgemeines über Muzine	- 20 -
1.4.2	11p15-Muzine	- 22 -
1.4.3	MUC5AC	- 23 -
1.4.4	MUC5B	- 23 -
1.5	ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	- 24 -

2	MATERIALIEN UND METHODIK	- 25 -
2.1	MATERIALIEN	- 25 -
2.1.1	Geräte und Zubehör	- 25 -
2.1.2	Proben	- 28 -
2.1.2.1	Standard-Kontrollprobe	- 28 -
2.1.2.2	CF-Proben	- 28 -
2.1.2.2.1	Auswahlkriterien	- 28 -
2.1.2.3	ETT-Proben für den Western Blot und DNS-Messung	- 29 -
2.2	METHODEN	- 31 -
2.2.1	Western Blot	- 31 -
2.2.1.1	Gelzubereitung	- 31 -
2.2.1.2	Verarbeitung der Proben	- 31 -
2.2.1.3	Zubereitung der 10% Stocksolution	- 32 -
2.2.1.4	Zubereitung des Running-Buffers	- 32 -
2.2.1.5	Zubereitung des Transfer-Buffers	- 32 -
2.2.1.6	Zubereitung der 10% Milch	- 32 -
2.2.1.7	Zubereitung der Antikörper	- 33 -
2.2.1.7.1	Details der primären Antikörper	- 33 -
2.2.1.8	Gelelektrophorese	- 34 -
2.2.1.9	Auswertung	- 35 -

2.2.2	DNS Analyse	- 37 -
2.2.2.1	Ansetzen der 20 %SSC (Standard-Saline-Citrate) -Lösung	- 37 -
2.2.2.2	Ansetzen einer Hoechst-Lösung	- 37 -
2.2.2.3	Ansetzen einer DNS-Standardlösung	- 37 -
2.2.2.4	Messung	- 37 -
2.2.2.5	Auswertung	- 38 -
2.2.3	Statistik	- 38 -
3	ERGEBNISSE	- 39 -
3.1	RESULTATE DER WESTERN BLOT-MESSUNG	- 39 -
3.2	RESULTATE DER DNS-MESSUNG	- 43 -
4	DISKUSSION	- 44 -
4.1	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	- 46 -
5	QUELLENVERZEICHNIS	- 48 -
6	DANKSAGUNG	- 58 -
7	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	- 59 -

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
ASL	Airway Surface Layer; Atemwegs-Oberfläche
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
BRD	Bundes Republik Deutschland
cAMP	cyclic Adenosin monophosphat
CB	Chronische Bronchitis
CBAVD	Kongenitale Bilaterale Aplasie des Vas Deferens
CF	Cystische Fibrose, engl.: cystic fibrosis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
COPD	Chronisch obstruktive Bronchitis/ chronic obstructive pulmonary disease
Da	Dalton, Einheit der molekularen Masse; kDa =1.000 Da; MDa = 1.000.000 Da
DIOS	distal intestinal obstruktives Syndrom
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPB	Diffuse Panbronchiolitis
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ETT	Endotrachealer Tubus
FVC	Forcierte Vitalkapazität

FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec.
H ₂ O	chem. Bezeichnung für Wasser
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
hnRNS	Heterogene Ribonukleinsäure
MSD1	first membrane spanning domain
MSD2	second membrane spanning domain
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MUC5AC	humanes Mucin 5AC
MUC5B	humanes Mucin 5B
NaCl	Natrium- Chlorid
NBD-1	Nuclear Binding Domäne 1
NBD2	Nuclear Binding Domäne 2
NHTBE	normal human tracheobronchial epithelial
Nm	Einheit; Nanometer
No	Nummer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCD	primär ziliäre Dyskinesie
PCL	periciliar layer
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	pondus Hydrogenii
PTS	Prolin-Threonin-Serin
RhDNAse	Recombinante DNase
RPM	rounds per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	Standard-Saline-Citrate

SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
tRNS	transfer Ribonukleinsäure
USA	United States of America
VNTR	Variable Nummer von Tandem-Repeats
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Mukoviszidose

1.1.1 Allgemeines

Mukoviszidose (synonym: CF, Cystische Fibrose, engl.: cystic fibrosis) ist bis heute eine lebenslimitierende vererbte Stoffwechselerkrankung, die alle Organe des Menschen im unterschiedlichen Ausmaß betreffen kann. Die derzeitigen Therapieformen und Medikamente haben die Lebenserwartung von Patienten mit CF seit Beschreibung der Krankheit in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts deutlich ansteigen lassen, so dass die meisten Patienten in Deutschland heute mit einer kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit von >44 Jahren (Quelle: Qualitätssicherung Mukoviszidose 2007) das Erwachsenenalter erreichen^{2, 20}. Eine Heilung ist jedoch bislang nicht möglich. In Deutschland leiden aktuell etwa 6.000 bis 8.000 Menschen unter dieser Krankheit (Schätzung Christiane-Herzog-Stiftung und Mukoviszidose e.V.).

Die Erkrankung entsteht durch eine autosomal-rezessiv vererbte Mutation des CFTR-Gens⁷³ und ist mit einer Trägerprävalenz von ca. 4%, eine der häufigsten zum Tode führende Erbkrankheit unter Kaukasiern, gleichwohl in anderen ethnischen Gruppen die Erkrankung weitaus seltener zu finden ist. Die Inzidenz dieser Erkrankung liegt in Deutschland bei einem Erkrankten pro 3300_[a]. CFTR steht für Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator und ist ein Chloridkanal, der hauptsächlich die Chloridpassage in den apikalen Zellmembranen der Drüsen reguliert⁵. Durch Fehlen dieses Chloridkanals, respektive seiner Fehlfunktion, kommt es auf Zellebene zu einem Ungleichgewicht der Elektrolyte und zu folgeschweren Sekretveränderungen, die zu einer progressiven Insuffizienz des respiratorischen und gastrointestinalen Systems führen⁸.

1.1.2 Klinik

Vor eindeutiger Diagnosestellung der Mukoviszidose kann man in 10%-20% der Fälle bei erkrankten Kindern bereits intrauterin (sonographisch) ein Mekoniumileus sehen. Weiterhin entwickelt sich in über 95% der Fälle im Laufe des Lebens der Erkrankten eine Wachstumsretardierung, unter anderem aufgrund der Pankreasinsuffizienz und der damit verbundenen Maldigestion und Steatorrhoe.

Charakteristisch für die Mukoviszidose ist allerdings die progressive, rasch auftretende pulmonale Veränderung, die sich durch häufiges Husten, persistierende und zähe Schleimauswürfe, Luftnot und eine frühzeitige Kolonisation mit Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylokokkus aureus* kennzeichnet^{26, 78, 79}. Im Laufe der Erkrankung entwickeln die Patienten häufig pulmonale Exazerbationen (eine klinische Verschlechterung ihres pulmonalen Zustands), meist verursacht durch eine bakterielle Infektion der Atemwege. Weitere Veränderungen sieht man radiologisch, anhand von Infiltraten und einer Überblähung der Lunge, funktionell in einer progressiven Verschlechterung der Lungenfunktion und physisch in einem niedrigen BMI, beziehungsweise in Form einer Mangel-/Unterernährung.

Nicht alle der folgenden klinischen Symptome (Tabelle 1) müssen vorhanden sein, um eine Mukoviszidose zu diagnostizieren. Die Erkrankung zeichnet sich durch eine Variabilität in ihrer Erscheinung aus, so dass einige Patienten erst spät im Alter klinisch auffallen oder unentdeckt bleiben²⁵.

Zusammenfassend lassen sich die in Tabelle 1 dargestellten typischen klinischen Merkmale bei der Mehrzahl an Mukoviszidose Erkrankten finden.

Tabelle 1: Klinische Merkmale der Mukoviszidose. Die Erkrankung Mukoviszidose ist eine Systemerkrankung und durch verschiedenste Symptome gekennzeichnet, die je nach Schweregrad der Erkrankung unterschiedlich ausgeprägt sind oder wie bei der CBAVD als eigenständiges Syndrom vorkommen können.

1. Rezidivierende pulmonale Exazerbationen mit exzessiver Sputumproduktion und Sekretretention
 2. Chronische Infektion der Lungen u.a. mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza* und *Burkholderia cepacia*
 3. Kontinuierliche Abnahme der Lungenfunktion (FEV₁-Abfall)
 4. Allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)
 5. Bronchiektasen (irreversible Bronchienausweitung) und Atelektasen (Belüftungsstörung der Lunge)
 6. Rezidivierende Sinusitiden
 7. Nasale Polypen
 8. Exokrine Pankreasinsuffizienz durch Fibrose des Parenchyms und chronischen Pankreatiden
 9. Diabetes mellitus durch Insulinmangel/ endokrine Pankreasinsuffizienz
 10. Chronische Leberzirrhose mit Malabsorptions-assoziierten Symptomen wie Vitaminmangel, Anämien, Blutgerinnungsstörungen, Mangelernährung, Untergewicht
 11. Distal intestinal-obstruktives Syndrom (DIOS)/ Mekoniumileus⁶⁵
 12. Männliche Infertilität durch Congenitale Bilaterale Aplasie des Vas Deferens (CBAVD)
 13. Verminderte Fertilität der Frau durch zähen, Spermien undurchlässigen Schleim des Uterus
 14. Osteoporose und Vitamin D- Mangel durch Mangelernährung
-

1.1.3 Diagnostik

Die Diagnose der CF ist wahrscheinlich, wenn klinische Merkmale und eine Kombination der folgenden Untersuchungsergebnisse pathologisch sind. Ausgenommen wird hier die Erwähnung des neonatalen Screenings auf IRT (Immunreaktives Trypsin), da es in Deutschland bisher nicht Gegenstand des Neugeborenen-Screenings ist.

1.1.3.1 Pilocarpin- Iontophorese- Schweißtest

Nach Stimulation mit Pilocarpin (direktes Parasympathikomimetikum) wird die Schweißsekretion analysiert. Pathologisch ist das Ergebnis bei einem NaCl-Gehalt >60 mmol/l.

1.1.3.2 Transepitheliale Potenzialdifferenz

Liegt der Ausgangswert am respiratorischen Epithel der Nase >-60 bis -100 mV und erfolgt kein Anstieg nach Gabe von Natriumglukanat und Isoproterenol, gilt das Ergebnis als pathologisch.

1.1.3.3 Mutationsanalyse

Eindeutig für die Diagnose, ist eine Genanalyse der häufigsten Mutationen (siehe Tabelle 2). Wichtig für die Analyse ist die Kenntnis der ethnischen Zugehörigkeit des fraglich Erkrankten, da in gewissen ethnischen Populationen andere Mutationshäufigkeiten auftreten als beispielsweise bei Kaukasiern.

Bei der weltweit häufigsten Mutation F508del kommt es durch ein Wegfall (Deletion) der Aminosäure Phenylalanin an Position 508 des CFTR-codierenden Abschnittes zur Verschiebung des Leserasters, wodurch es zu einer Veränderung in der Proteinverarbeitung im endoplasmatischen Retikulum kommt.

Insgesamt sind über 1900 Mutationen (inklusive Polymorphismen) dieses Proteins bekannt_[b], die sich in einem unterschiedlichen Ausmaß klinisch manifestieren können: So werden Betroffene gesehen mit einem ausgeprägten Phänotyp der Krankheitsmerkmale der Cystischen Fibrose, mit asymptomatischen Verläufen oder einer milden Symptomatik mit ausschließlich pulmonaler Beeinträchtigung⁹. Bei der CBAVD

(Kongenitale Bilaterale Aplasie des Vas Deferens) spricht man sogar von einer eigenständigen Erkrankung³⁹.

Bisher konnte bei der Pankreasfunktion mutationklassenabhängig eine Korrelation des Krankheitsschweregrades in Abhängigkeit der Mutation hergestellt werden^{49, 98}. In Mutationsklasse 1 führen die Mutationen dazu, dass der Proteinsynthese-Mechanismus defekt ist. Folgend wird das CFTR-Protein vollständig proteolytisch abgebaut. Der CFTR-Kanal fehlt und führt zu einem schweren klinischen Verlauf der Erkrankung. Zu der Mutationsklasse 2 gehört die weltweit häufigste Mutation F508del: ein fehlerhaftes Falten dieses Proteins im Endoplasmatischen Retikulum führt zu einer eingeschränkten Funktion des CFTR-Kanals. Diese Klasse zeichnet sich ebenfalls durch ihren schweren klinischen Verlauf aus. In Mutationsklasse 3 wird das Protein regelrecht prozessiert und intakt in der apikale Zellmembran eingebaut, allerdings spricht der Kanal durch fehlende ATP-Bindung nicht auf cAMP-Änderungen an. Die notwendige Phosphorylierung durch Protein-Kinasen bleibt aus. Es zeigt sich eine milde klinische Manifestation. Die Mutationsklasse 4 beinhaltet einen Defekt im Chloridtransport, so dass der CFTR-Kanal intakt ist, aber nicht adäquat funktioniert. Mutationen, die in diese Klasse gehören, zeichnen sich durch einen milden Verlauf aus. Zu der Mutationsklasse 5 gehören Mutationen, die das enzymatische Abtrennen von Introns fehlregulieren. Die klinischen Merkmale sind in dieser Gruppe sehr variabel.

Mittlerweile weiß man, dass verschiedenste Umwelt-Faktoren, aber vor allem Interaktionen zwischen modifizierenden Faktoren/Genen und der jeweiligen Mutation den Verlauf sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können^{100, 108, 109}.

Tabelle 2: Mutationsklassen und Frequenz der CF-Mutationen im deutschen Patientenkollektiv. Die einzelnen Mutationen auf dem Chromosom 7, die den CFTR-Kanal codieren, wurden aufgelistet nach Mutationsklassenzugehörigkeit³⁹ und Häufigkeit im deutschen Patientenkollektiv (adaptiert entnommen aus WHO-Report_[c]). Insgesamt sind 1900 Mutationen (*inklusive Polymorphismen*) dieses Proteins bekannt.

Mutation	Mutationsklasse	Frequenz (%)
F508del	2	70,2
N1303K	2	2,5
G542X	1	2,1
G551D	3	2,0
R553X	1	1,5
CFTRdele2,3(21kb)		1,5
R347P	4	1,4
1717-1G>A	1	1,2
3849+10kbC>T	5	1,1
R117H	4	0,9
2789+5G>A	5	0,8

1.1.4 CFTR (ein Chloridkanal)

Das CFTR-Gen liegt auf dem 7q31.2-Chromosom und codiert für einen membranständigen Chlorid-Kanal, der zum einen die cAMP-abhängige Chloridpassage in vorwiegend Epithelzellen steuert, zum anderen direkt mit dem Natrium-regulierenden Kanal ENaC interagiert^{71, 72}.

Der CFTR-Kanal wird hauptsächlich in submukösen Drüsen²² und in Mukus-produzierenden Epithelien exprimiert wie in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt, aber auch im Parenchym der Nieren, im Herzen, Gehirn und in den Schweißdrüsen⁹⁷.

1.1.4.1 Molekulare Pathogenese

CFTR ist ein membranständiges Protein, das aus 1480 Aminosäuren besteht, eine molekulare Masse von 168.138 Da hat und die Chloridpassage steuert (siehe Abbildung 1). Dieses Protein gehört zu den ABC (ATP-Binding-Cassette)-Proteinen, die aus 2 Einheiten (MSD1 und MSD2) bestehen. Beide Einheiten haben jeweils 6 Membranbrückenregionen. Die zwei Einheiten MSD1 und MSD2 sind durch eine Nuclear Binding Domäne (NBD-1) verknüpft, die ATP bindet und die Kanalöffnung kontrolliert. NBD-1 und MSD2 sind durch eine, nur für dieses Protein einzigartigen, R-Domäne verbunden, die aus vielen geladenen Aminosäuren besteht. Sie werden durch

Protein-Kinasen cAMP-abhängig phosphoryliert. MSD2 ist weiterhin mit einer Nuclear Binding Domäne (NBD-2) verbunden, die, wie alle zuvor genannten Einheiten, Ausgangspunkt für Mutationen sein können und die Kanalöffnung ebenfalls kontrolliert.

Die weltweit am häufigsten auftretende Mutation F508del befindet sich in der Nuclear Binding Domäne-1⁵⁷.

Klinisch fatal sind die Folgen dieser Mutationen im respiratorischen System, da das Fehlen oder defekte Funktion dieses Chloridkanals die Lunge innerhalb kurzer Zeit insuffizient werden lässt: zum einen durch die mechanische Obstruktion des Sputums in den Bronchien, womit unter anderem die notwendige Sauerstoffsättigung eingeschränkt wird, zum anderen durch häufige pulmonale Exazerbationen der chronisch mit verschiedensten Bakterien besiedelten Lunge.

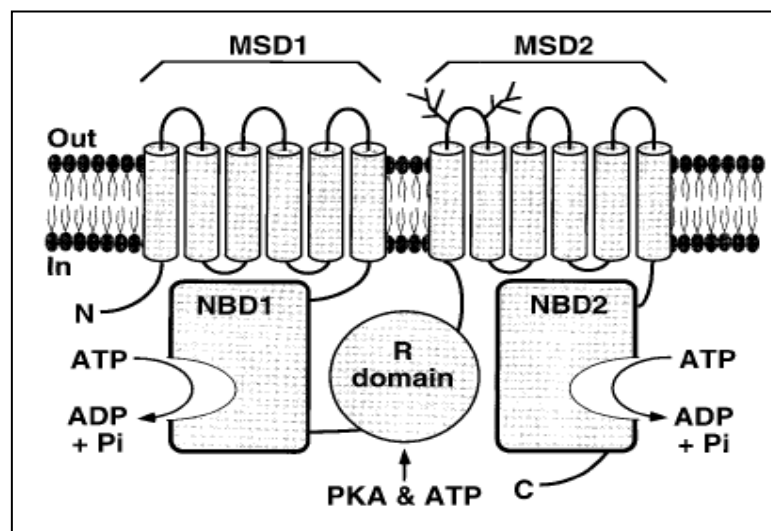


Abbildung 1: Der CFTR-Kanal. Er reguliert das Chloridgleichgewicht und hat eine inhibitorische Wirkung auf den ENaC-Kanal. Zu sehen sind verschiedenen Einheiten des Kanals (MSD-1, MSD-2, NBD-1, R, NBD-2), die jeweils Ausgangspunkt für Mutationen sein können. Die häufigste Mutation unter Kaukasiern, F508del, betrifft die Domäne NBD-1, die durch ATP aktiviert wird. (Entnommen von ⁸⁸)

1.1.4.2 Ionenströmungen in der Zelle

In einer gesunden Zelle wird Chlorid durch verschiedene Kanäle geleitet⁶². Der dominierende Kanal ist der cAMP-abhängige CFTR-Kanal. Dieser reguliert hemmend den Natriumkanal ENaC⁶⁰. Andere Kanäle sind unter anderem Kalzium-abhängige Chlorid-Kanäle⁵⁹.

Bei der CF-Erkrankung kommt es durch Fehlen des Chloridkanals zu einer Steigerung der Natriumabsorption^{50, 91} und nachfolgenden osmotischen Wassergradienten. Die Sekrete, wie Mukus im respiratorischem System, werden eingedickt⁸ und disponieren so zu weiteren obstruierenden Faktoren. Möglicherweise begünstigen diese Sekretveränderungen die Stase und Entstehung dieses zähen und dickflüssigen Sekrets in Lunge, Pankreas und Intestinaltrakt. Möglicherweise sind auch andere Bestandteile dieser Sekrete verändert. So kommt es nicht nur zu Ungleichgewichten im Elektrolytbereich, sondern unserer Hypothese zufolge zu Veränderungen bezogen auf die Makroproteine wie DNS und Muzine, die für die Beschaffenheit dieser Sekrete maßgeblich sind.

1.2 Mukus

Mukus ist ein protektives, hauchdünnes Sekret, das viele Hohlorgane auskleidet und eine Barriere zwischen Schleimhaut und Umwelteinflüssen darstellt.

Ganz besonders wichtig ist dieser Schutzfilm in der Lunge, da er dort das Lungenparenchym vor Partikeln aus der Atemluft schützt und verhindert, dass unter anderem Bakterien und chemische Noxen (wie beispielsweise Enzyme aus neutrophilen Leukozyten) dort Schäden verursachen^{45, 76}.

Mukus besteht aus Wasser, Ionen, Lipiden, Muzinen (1000-5000 kDa), Muzin-Glykopeptiden (200-500 kDa), Immunglobulinen, anderen Proteinen und Zellresten. Muzine scheinen für die Bindung von Partikeln jeglicher Art verantwortlich zu sein^{51, 52}.

Mukus wird von exokrinen Drüsen produziert. Im Intestinaltrakt sezernieren die Brunnerdrüsen und Becherzellen vor allem Mukus, um vor Eigenverdauung, bzw. vor Angriff der Verdauungsenzyme sich zu schützen. Die Passage der Nahrungsmasse wird dadurch erleichtert. In gesunden Schweißdrüsen wird im Azinus elektrolytkonzentriertes Schweißsekret produziert und sezerniert, und im Drü-

senabschnitt zu einem hypotonen Sekret verändert. Im Reproduktionstrakt erhält der Mukus das Epithel feucht und gleitfähig.

Speziell auf die Lunge bezogen erscheint das Modell von Boucher^{8, 45} hilfreich, da es einen Erklärungsansatz darstellt, warum CF-Patienten pulmonal vulnerabel sind:

Boucher et al. unterteilen die Oberfläche des Lungenparenchyms in eine perziliäre Schicht (PCL), und die oben beschriebene Mukusschicht, die man zusammen als Atemwegs-Oberfläche (ASL; Airway Surface Layer) bezeichnen kann. Die PCL ist die Schicht, in der die Zilien des Lungeepithels eingebettet sind, und die die Bestandteile der Mukusschicht per Zilienschlag Richtung Mundraum befördern, um dort den übermäßig-produzierten Schleim schluckbar oder abhustbar zu machen. Das Zusammenspiel dieser einzelnen Kompartimente ist bei CF-Erkrankten defekt, da sie nicht in der Lage sind, die einzelnen Ionengradienten zu regulieren: Durch die exzessive Natrium-/Wasserabsorption und verminderte Chlorid-Passage wird die PCL dünner. Die Zilien können sich nicht entfalten, um den zähen Mukus aus der Lunge zu transportieren. Die Mukusschicht, die normalerweise eingefangene Partikel aus der Lunge heraus manövrieren soll, kommt durch die dünner werdende PCL in Kontakt mit der Zelloberfläche und verklebt dort mit dieser⁶³. Dieser Zustand fördert die Ansiedelung von Bakterien und entfacht eine Entzündungsreaktion und Kaskade, die einen weiteren obstruierenden Faktor entstehen lässt: Sputum.

1.3 Sputum

Im Gegensatz zu Mukus, der bei jedem gesunden Mensch die verschiedenen Organe hauchdünn auskleidet, ist Sputum ein pathologisch-produziertes Sekret in der Lunge, das in hohen Mengen bei entzündlichen Lungenerkrankungen (zum Beispiel bei CF, Asthma bronchiale, chronischer Bronchitis und DPB) gebildet wird. Es entsteht durch Entzündungsprozesse am luminalen Epithel und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Morbidität/Mortalität der CF-Erkrankten⁴².

Dieses Sekret, welches wegen seiner obstruierenden Menge expektoriert werden muss, besteht aus Wasser, Entzündungszellen (hauptsächlich neutrophilen Leukozyten), deren abgestorbenen und lysierten Zellbestandteilen (hauptsächlich DNS), aus zellulären

Produkten, die die Bakterien abwehren (unter anderem Laktoferrin, Lysozyme, Defensine), aus Proteinen (unter anderem Muzine) und Lipiden^{11, 38}.

1.3.1 Zusammenfassung der CF-Pathophysiologie

Bei der Cystischen Fibrose vermutet man, dass durch den fehlenden CFTR-Kanal und aufgrund der fehlende Hydratation, Mukus respektive Sputum zäh und schwer ziliär zu transportieren ist^{26, 63}. Es kommt zu Obstruktion und Ansammlung von zähem Sputum in den Bronchien, welches eine Nische für eine chronische Ansiedlung von Bakterien darstellt. Dabei wird den Bakterien Schutz vor Abtötung geboten und das Lungengewebe somit einer Art Dauerentzündung ausgesetzt⁸. Durch hauptsächlich nachfolgender neutrophiler Infiltration und abschließendem Zugrundegehen dieser neutrophilen Leukozyten, wird deren DNS frei und erhöht die Viskosität des Sputums^{40, 70, 85}. Infolge der chronischen Entzündung und den Entzündungsmediatoren entsteht eine Hyper-/Metaplasie der Mukus-produzierenden Zellen und eine Steigerung der Menge des obstruierenden Sputums⁴⁷. Weiterhin hat der CFTR-Kanal Auswirkungen auf Proteine, Elektrolyte und Säuren/Basen. Im Falle der chronische Pankreasinsuffizienz bei Mukoviszidose wird das Bikarbonat vermindert sezerniert und initiiert somit die enzymatische Eigenverdauung⁴⁸. Die Unterschiede in der Elektrolytzusammensetzung lösen insgesamt Kaskaden aus, die zu pH-Veränderungen führen⁹², wodurch die Glykolisierung, Sulfatierung von Proteinen verändert wird, und wie in der Lunge zu Infektionen prädisponieren^{3, 15}. Diese Änderung im pH ist ebenfalls mit der Änderung der Beschaffenheit (Viskosität) von Mukus verbunden³⁴.

Das Verständnis der Zusammensetzung des Sputums ist insofern relevant, da sich bei CF-Patienten das Lungenparenchym innerhalb kurzer Zeit von einem initial intakten System¹⁷, zu einem vulnerablen System verändert. Grundlegend stellt sich die Frage, ob und wie bei der Cystischen Fibrose die Zellen des Lungenparenchyms zu dieser chronischen bakteriellen Besiedelung beitragen. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass bei CF Entzündungsmediatoren durch eine Mutation verändert sind⁹⁹, dass möglicherweise durch die CFTR-Fehlfunktion Defensine und antimikrobielle Peptide verändert werden⁸⁹ und wie kürzlich gezeigt, sogenannte Toll-like Rezeptoren durch verminderter Oberflächenexpression zu einer Beeinträchtigung der Immunantwort führen können³⁶.

1.4 Muzine, ein Bestandteil des Mukus

Muzine sind Bestandteile der meisten Sekrete des menschlichen Organsystems und können auch in Zellmembranen eingebaut werden (siehe Abbildung 2 und Tabelle 2). Eine Aufgabe der Muzine ist die Bindung von Pathogenen, die in die Atemwege gelangen, wie zum Beispiel die Bindung von *Pseudomonas aeruginosa*^{61, 68}. Im Allgemeinen sind sie weiterhin für die rheologischen, schützende und reinigenden Aufgaben des Mukus verantwortlich^{81, 96}.

1.4.1 Allgemeines über Muzine

Muzine sind schwere, verzweigte Glykoproteine mit einem molekularen Gewicht von $2 \cdot 10^5$ Da und können aus 377 bis ≥ 11.000 verschiedenen Aminosäuren bestehen. Muzine besitzen Prolin-Threonin-Serinreiche Domänen⁹⁴, an denen zahlreiche unterschiedlich lange O-/und N-gekoppelte Zuckerreste seitlich vernetzt sind^{23, 52}. Jedes Muzin besitzt eine charakteristische PTS-reichen Sequenz (PTS: Prolin, Threonin, Serin), die sich Domänen-abhängig mehrmals wiederholen kann. Diese Domänen werden dann als Tandem-Repeat Domänen bezeichnet und werden durch eine bis zu 115 malige Wiederholungsmöglichkeit als VNTR (variable Nummer von Tandem-Repeats) bezeichnet und darüber hinaus individuell exprimiert (Sequenz-/ und Längenpolymorphismus)⁷⁶. Die Zuckerketten, die ausschließlich an den PTS- Regionen vernetzt sind, können aus 2 bis 20 unterschiedlichen Monosacchariden bestehen und machen $\geq 50\%$ des molekularen Gewichts eines Muzins aus²¹. Diese unterschiedlich langen Zuckerketten entstehen durch eine initiale Bindung von N-acetyl-galactosamin (GaINAc) an die PTS-Region. Diese Kohlenhydratketten sollen Bindungsstellen für Mikroorganismen sein, die dort gebunden werden um per Zilienschlag entfernt werden zu können⁵².

Unter dem Elektronenmikroskop sehen Muzine wie lange, flexible Fäden aus. Die zwischen einer PTS-Region gelegene Abschnitte (ohne Verknüpfung mit Zuckerketten) sind möglicherweise Angriffspunkte für Proteasen und somit Regionen der Fragmentierung^{86;52}. Die zerschnittenen Muzine nennt man Muzin-Glykopeptide. Das einzelne Muzinprotein wird durch Disulphidbrücken der nicht glykolisierten Bereiche stabilisiert^{95, 105}. Darüber hinaus können Muzinproteine durch nicht-kovalente

Interaktionen an einander gebunden werden. Diese Bindung kann durch leichtes rühren/scheren in denaturierender Lösung gelöst werden^{12, 87}.

Die sekretorischen Muzine werden in vielen Epithelien gebildet und dort als Bestandteile des Mukus in Auge, Gallenblase, Zervix, Atemwege, Darm und in den verschiedenen Glandulae des Mundraums sezerniert. Neben den bereits beschriebenen Funktionen, werden sie unter anderem in neoplastischen Erkrankungen vermehrt exprimiert: Ein bekanntes Muzin ist der Tumormarker CA-125¹⁰⁷.

Mittlerweile sind 20 verschiedene Muzin-Typen auf 12 Chromosomdomänen identifiziert (siehe Tabelle 2) und zum größten Teil sequenziert worden.

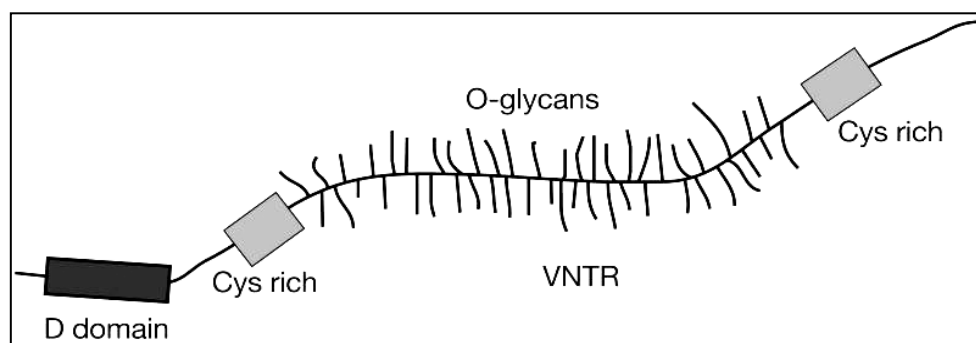


Abbildung 2: Aufbau eines Muzins.

Gezeigt wird die vereinfachte Struktur eines Muzins mit der VNTR (variable number of tandem repeat)-Region, an der die Glykolisierung stattfindet. Die Cystein-reichen Domänen (*Cys rich*) und die D-Domäne (*D domain*) dienen der Polymerisierung (entnommen aus [d])

Tabelle 2: Klassifizierung der Muzinfamilie. Geordnet nach Lokalisation auf den Chromosomen und nach Struktur⁷⁶. Die Muzine, die in dieser Arbeit bearbeitet wurden, MUC5AC und MUC5B, sind hervorgehoben.

Muzin	Chromosomen	Struktur
MUC1	1q21	Membranprotein
MUC9	1q13	Sekretor.Protein
MUC13	3q13.3	Membranprotein
MUC4	3q29	Membranprotein
MUC20	3q29	Membranprotein
MUC7	4q13.3	Sekretor.Protein
MUC3A	7q22	Membranprotein
MUC3B	7q22	Membranprotein
MUC11	7q22	Membranprotein
MUC12	7q22	Membranprotein
MUC17	7q22	Membranprotein
MUC2	11p15.5	Sekretor.Protein
MUC5AC	11p15.5	Sekretor.Protein
MUC5B	11p15.5	Sekretor.Protein
MUC6	11p15.5	Sekretor.Protein
MUC15	11p14.3	Keine Angaben
MUC18	11p23.3	Keine Angaben
MUC19	12q12	Sekretor.Protein
MUC8	12q24.3	Sekretor.Protein
MUC16	19q13.2	Membranprotein

1.4.2 11p15-Muzine

Gegenstand dieser Arbeit sind zwei Muzine auf Chromosom 11p15.5:

MUC5AC und MUC5B

Die vier auf Chromosom 11p15.5-gelegenden Muzine (MUC2, MUC5AC, MUC5B und MUC6), die sich in Funktion und Aussehen von Muzinen anderer Chromosomen unterscheiden, haben spezifische Ähnlichkeiten untereinander: Auf ihrer Sequenz sind Von-Willebrand-Faktor-Domänen (VWF) und eine C-Domäne zu finden. Des weiteren haben drei dieser 11p15.5-Muzine, MUC2, MUC5AC und MUC5B, für sie einzigartige und charakteristische Cystein-reiche Domänen^{83;21}. MUC5AC und MUC5B werden hauptsächlich in den unterschiedlichen Zellen des Lungenparenchyms sezerniert^{35, 105}.

Die Notwendigkeit, diese Muzine und ihre Funktionen zu verstehen, steht im Kontext mit der allgemein geäußerten Annahme, dass sie entscheidend zur Zähigkeit des Sputums beitragen und diese die fatale Rolle in Mukoviszidose-Erkrankungen ist⁷⁴.

Die Transkriptionsrate der Muc-Gene kann experimentell durch Entzündungsmediatoren in Zelllinien gesteigert werden⁷, wie zum Beispiel durch Interleukine, durch die Neutrophile Elastase^{46, 103}, durch Tumor-Nekrose-Faktor α ⁵⁶, durch NF- κ B⁵⁸ und anderen Mediatoren.

Basbaum et al. zeigten, dass die Transkription von MUC2 und MUC5AC, in vitro, durch bakterielle Bestandteile, Umwelttoxene, Tabakrauch und Cytokine gesteigert wird und folgerten daraus die enorme Bedeutung dieser "Muzine-Hypersekretion" für Erkrankungen wie Asthma bronchiale und CF⁴.

Auch Kirkham⁴⁴ konnte zeigen, wie die Konzentration von MUC5AC und MUC5B in Sputen-Proben von Asthmatikern verglichen mit gesunden Kontrollproben erhöht sind und setzte auch dieses Ergebnis gleich mit den anderen hypersekretiven Erkrankungen wie CF und CB.

1.4.3 MUC5AC

Das Mucin MUC5AC wird hauptsächlich von den Becherzellen des respiratorischen Systems gebildet^{10, 35}. Es besitzt 4 Tandem-Repeat-Sequenzen, die sich individuell häufig wie-derholen können. Induziert durch bakterielle Bestandteile von *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*^{37, 54, 104} wird MUC5AC vermehrt transkribiert. Im Mausmodell konnte darüber hinaus die Expression durch neutrophile Elastase, einem Entzündungsparameter, gesteigert werden¹⁰³. Die Transkription wird insgesamt über verschiedene Tyrosin-Kinase-Kaskaden reguliert⁵³. MUC5AC wird intrauterin ab der 13. SSW in den Becherzellen der Trachea und Bronchien gebildet¹⁰.

1.4.4 MUC5B

Das Mucin MUC5B wird hauptsächlich von den submukösen Drüsen^{28, 105} und zum Teil von den Becherzellen⁸⁴ des respiratorischen Systems gebildet. Es hat 5 Tandem-Repeat-Domänen, die sich ebenfalls individuell häufig wiederholen können und die durch Cystein-reiche Bereiche unterteilt werden.

Es existieren zwei Formen dieses Muzins, die gleichzeitig in den Sekreten zu finden sind. Eine Glykoform ist kleiner (low charge) und die andere größer und schwerer (high charge). Bei der Proteolyse dieses Muzins werden hauptsächlich die terminalen C-Bereiche fragmentiert¹⁰⁵. MUC5B wird intrauterin ab der 27. SSW in den submukösen Drüsen des respiratorischen Epithels gebildet¹⁰.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Bis heute vermutet man, dass bei chronisch-entzündlichen, pulmonalen Erkrankungen wie bei der Mukoviszidose, die Masse an Sputum, durch eine exzessive Biosynthese von makromolekularen Muzinen (vornehmlich MUC5AC und MUC5B) verursacht wird^{1, 18, 19, 53}.

Erstmals haben sich Henke et al.³² mit einem signifikanten CF-Patientenkollektiv auseinandergesetzt, um den quantitativen Nachweis von Muzinen im Sputum Erkrankter mit dem von Gesunden zu vergleichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Muzine MUC5AC und MUC5B im Sputum von CF-Patienten vermindert nachzuweisen waren.

Hier möchten wir an diese Ergebnisse anknüpfen und zeigen, wie in 11 gepaarten CF-Sputaprobe die Muzine MUC5AC und MUC5B sich semiquantitativ während einer pulmonalen Exazerbation nachweisen lassen und wie hoch deren absolute DNS-Konzentration in diesen Krankheitsverläufen nachweisbar ist. Die Ergebnisse werden mit 11 Sputaprobe einer gesunden Kontrollgruppe ETT verglichen. (Ergebnisse publiziert 2007²⁹, siehe Anhang).

2 Materialien und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Zubehör

	Hersteller
Nunc–Immuno Plate 96 K	Kobe, Marburg
LIA–Plate schw./weiss 96 K	
greiner bio-one	Kobe, Marburg
Certified 1, 5 ml Conical Tube	Starlab, Ahrensburg
Certified 2, 0 ml Conical Tube	Starlab, Ahrensburg
Certified Standard Cap with O-ring	Starlab, Ahrensburg
SulfoLink Kit	Pierce, Bonn
BCA-Kit	Pierce, Bonn
Scion Image 4.0.2 for Windows	National Institutes of Health, Bethesda, MD
SPSS 11.5.1 for Windows	SAS Institute, USA
Canon Scan Lide 30	Canon, Krefeld
POLARstar Optima	BMG-labtech, Offenburg
Schüttler Heidolph Promax 108	Kobe, Marburg
Transfer Box	Eigene Herstellung
Western Blot Boxen (15x15 cm)	Owl Separation Systems, USA
Dot-Blot Systems	Schleicher&Schuell, Bruchsal
Universal Zentrifuge RF 30	Hettich, Tuttlingen
Mikrowellenofen privileg 8250	Privileg
Vortex Genie 2 Scientific Industries	Kobe, Marburg
Spectrafuge mini Hermle	Kobe, Marburg
Heater und Magnetrührer	
Heidolph MR 3001	Kobe, Marburg
Präzisionswaage Type 1507,1801	Sartorius, Göttingen
Schüttler Duomax 1030 Heidolph	Kobe, Marburg

Power pc 200 (Transfer)	Bio-Rad Laboratorien GmbH, München
Instant Magermilchpulver Saliter	Tegut, Marburg
50 ml sterile PP-Test tubes Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
12 x 15 cm , 8 x 15	
Protran® nitrocellulose	
Transfer and Immobilization Membrane	Schleicher&Schuell, Bruchsal
Photobox Special/Rapid 200	
Radiographic Products	Dr.Goos Suprema, Heidelberg
Filter Paper Criterion Blotter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kodak®X-Omat Blue XB-1 Film	Universität Marburg
<u>Antikörper:</u>	
Secondary HRP-labeled	
Goat- anti- rabbit antibody	Jackson-Immuno
Kaleidoskope® Prestained Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Antiserum LUM5B–2–WFU	
Rabbit # G226;Lot: 30756	Genemed Synthesis, Inc. San Francisco
Antiserum LUM5–1–WFU	
Rabbit # G224; Lot: 30755	Genemed Synthesis, Inc. San Francisco
<u>Pipetten :</u>	
Easypet Eppendorf	Kobe, Marburg
0.5– 10 µl Eppendorf Research	Kobe, Marburg
10– 100 µl Eppendorf Research	Kobe, Marburg
20– 200 µl Eppendorf Research	Kobe, Marburg
100– 1000 µl Eppendorf Research	Kobe, Marburg
10– 300 µl Finnpiquette® Thermo	

Labsystems	Kobe, Marburg
Drummond® Digital Microdispenser	Kobe, Marburg
Pipettenspitzen:	
0.1–10 µl Extended Length Filter Tips	Starlab, Ahrensburg
1–100 µl Bevelled Filter Tips	Starlab, Ahrensburg
101– 1000 µl Filter Tips	Starlab, Ahrensburg
1- 300 µl Graduated, Natural Tips	Starlab, Ahrensburg
10 ml, 5 ml ,20 ml Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Chemikalien:	
Tris/Glycine Buffer 0.025M/0.192M	MP Biomedicals, Ohio
PBS 10% Gibco	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Bonn
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Bonn
Kalb Thymus DNS	Sigma®, Taufkirchen
33258 Hoechst Stammlösung	CalBiochem®, Schwalbach
1.5x10 ⁻⁶ M	
SDS Solution 10 %	Bio-Rad Laboratorien GmbH, München
Bromophenol blue	Sigma®, Taufkirchen
L.M.P Agarose	Invitrogen GmbH , Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma®, Taufkirchen
Protease Inhibitor set I	CalBiochem®, Schwalbach

2.1.2 Proben

Die Sammlungsweise der Proben, die zur Analyse benutzt wurden, sind von den Institutional Review Boards for Human Research der Wake Forest University, Winston-Salem (USA) und der Universitätsklinik Marburg genehmigt worden.

2.1.2.1 Standard-Kontrollprobe

Um rechnerisch die einzelnen Proben vergleichbar zu machen, musste ein interner Standard erhoben werden, der als Referenz-/Bezugspunkt in jeder Messung dient. Das bedeutet, dass in den verschiedenen Western-Blots jede Probe (CF und ETT) mit demselben Standard (=100%) in Bezug gestellt wurde.

Als Standard diente das Sputum eines Patienten, der sich einer Lungentransplantation wegen schwerer Bronchiektasie unterziehen musste und nicht an CF erkrankt war. Vor der Transplantation wurde das zahlreich vorhandene Sputum entnommen, und wie die unten beschriebenen Proben verarbeitet.

2.1.2.2 CF-Proben

2.1.2.2.1 Auswahlkriterien

Die Proben wurden von CF-Patienten gesammelt, die sich in den Kliniken der Wake Forest Universität (USA) in Behandlung befanden (Tabelle 3).

Das Sputum wurde standardisiert während einer Lungenfunktions-Untersuchungen direkt in sterile Behälter ausgehustet, von Speichel visuell separiert und bei -70°C tiefgefroren¹¹. Alle Patienten waren pulmonal mit *Pseudomonas aeruginosa* chronisch besiedelt und inhalierten Dornase alpha, welches allerdings 24 Stunden vor Sputum-Expektion abgesetzt wurde.

Durch die zahlreichen Behandlungstermine, die die Patienten krankheitsbedingt hatten im Rahmen einer pulmonale Exazerbationen zum Beispiel, konnte von einigen Patienten ein „Verlauf“ (klinisch stabile Situation und pulmonale Exazerbation) an Proben gesammelt werden, so dass verschiedenen Krankheitsstadien eines einzelnen Probanden wiedergegeben werden konnte.

Bei der Sammlung des Sputums wurde darauf geachtet, dass bestimmte Kriterien erfüllt waren, die eine pulmonale Exazerbation der Probanden einheitlich und definierbar machen⁷⁷:

- Veränderung im FEV 1 (mind. 5 % im Vergleich zum letzten Krankenhausaufenthalt)
- Schlechter tolerierbare sportliche Belastung und Luftnot
- Vermehrter Husten und vermehrte Sputum-Blockierung in den Bronchien
- Veränderung der Blutgasanalyse
- Gewichtsabnahme

Bei der Sammlung der Proben in der klinisch stabilen Situation der einzelnen Probanden ist man davon ausgegangen, dass keiner der oben genannten Punkte auf den klinischen Zustand des Patienten zutraf. Alle Proben wurden gegen den internen Standard rechnerisch normiert.

2.1.2.3 ETT-Proben für den Western Blot und DNS-Messung

Um einen Vergleich von den unterschiedlichen Zusammensetzungen des Sputums zu haben, wurde Sputum von CF-Erkrankten mit Mukus einer gesunden Kontrollgruppe (ETT) verglichen. Diese unterzogen sich zum Zeitpunkt der Mukusentnahme einer nicht-thorakalen Operation und litten an keiner pulmonalen Erkrankung (Tabelle 4). Die 11 ETT-Probanden stellen den „nicht-CF-Zustand“ dar und dienen der Verdeutlichung, wie die relativen Konzentrationen der Muzine sich in „gesunden“ Proben nachweisen lassen. Weiterhin wurden deren absolute DNS-Konzentrationen [mg/dl] gemessen.

Der Mukus wurde gewonnen, indem man den Endotrachealen Tubus (ETT) nach der Operation auskratzte und den Mukus in kleine Behälter direkt bei -70°C einfro^{80, 82}. Die weitere Verarbeitung der ETT-Proben entspricht dem der CF-Proben. Alle Proben wurden gegen den internen Standard rechnerisch normiert.

Tabelle 3: Liste der CF Sputen-Proben aus den USA mit klinischen Eigenschaften. 11 Sputen-Proben von CF-Patienten, die im Wake-Forest-University-Hospital behandelt wurden und dort standardisiert expektoriert haben. Die Tabelle zeigt den klinischen Status des Patienten bei einem Behandlungstermin. Die Proben wurden auf ihre MUC5AC/MUC5B-Konzentration (semiquantitativ) und ihre DNS-Konzentration [mg/dl] mit ETT-Sputum verglichen.

ID #	Alter	Größe (Perzentile)	Gewicht (Perzentile)	Geschlecht	FVC%	FEV1%	Genotyp
1	9	5	5	weiblich	87	77	Homozygot dF508
2	10	50	50	männlich	24	17	dF508/unbekannt
3	21	10	5	männlich	94	74	Homozygot dF508
4	18	5	15	weiblich	51	32	Homozygot dF508
5	10	10	5	männlich	45	31	Homozygot dF508
6	19	10	25	weiblich	90	65	dF508/unbekannt
7	31	25	80	weiblich	47	31	dF508/unbekannt
8	31	1	1	weiblich	54	43	Homozygot dF508
9	36	40	60	männlich	103	78	Homozygot dF508
10	38	1	1	weiblich	59	39	Homozygot dF508
11	16	25	25	männlich	74	72	Homozygot F508

Tabelle 4: Liste der ETT-Probanden. Folgend sind die Sputa-Proben von 11 ETT-Patienten aufgelistet, die im Wake-Forest-University-Hospital behandelt wurden, sich dort einer Operation unterzogen, dort standardisiert Sputum entnommen bekamen, und die nicht an CF erkrankt waren. Diese wurden auf ihre MUC5AC/MUC5B-Konzentration (semiquantitativ) und ihre DNS-Konzentration [mg/dl] mit CF-Sputum verglichen.

ID #	Alter	Geschlecht	Diagnose/Operation
1	8	männlich	Exzision
2	12	männlich	Tonsillektomie
3	8	männlich	Knochenbiopsie
4	14	weiblich	Portwechsel
5	15	weiblich	Tonsillektomie
6	3	weiblich	Weichteileingriff
7	4	weiblich	Rhinoplastik
8	9	weiblich	Tonsillektomie
9	12	weiblich	Adenoidektomie
10	8	weiblich	Tonsillektomie
11	5	weiblich	Kathetereinlage

2.2 Methoden

2.2.1 Western Blot

2.2.1.1 Gelzubereitung

Das 1% Agarosegel (15x15 cm) wird in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich das Pulver vollständig und homogen in der Flüssigkeit aufgelöst hat. Erfahrungsgemäß ist das nach 3-4 min. gelungen. Nun wird das Gel, im heißen Zustand, in die Geltaschen der Western-Box gegeben und die dabei entstandenen Luftblasen herauspipettiert. Während das Gel langsam erkaltet und fest wird, werden die auftauenden aliquotierten Proben bearbeitet. Da zwei verschiedene Muzine in den Proben nachgewiesen werden sollen, muss man das Western Blot-System zwei Mal parallel aufbauen und simultan laufen lassen.

2.2.1.2 Verarbeitung der Proben

Das Original-Sputum wird aliquotiert und auf 1:10 verdünnt:

- 100 µl Sputumsample (100 µl mit Microdispender ® abgemessen)
- 890 µl PBS
- 10 µl Natriumacid, bzw. Proteinaseinhibitor (Protease Inhibitor set I, Cal Biochem)

Die Proben wurden vor dem aliquotieren homogenisiert, indem man das Sputum mehrmals durch 28G große Insulinnadeln zieht. Danach wurden sie aliquotiert, nochmals mehrmals durch 28G Insulinnadeln gezogen und schrittweise durch größerer Durchmesser geschoren, um eine optimale Durchmischung zu erhalten.

Für den Western Blot werden in 12 neue Röhrchen je 30µl 4x Laemni-buffer (250mM Tris pH 6.8; 4% SDS; 20% Glycerol; 0.001% bromophenol blue, 20 mM DTT) pipettiert und mit je 80 µl Samplemenge (Aliquots) eines Probanden vermischt. Diese neuen Röhrchen werden 5 min. bei 100° C gekocht und zuletzt nochmals in der Minizentrifuge vermischt.

2.2.1.3 Zubereitung der 10% Stocksolution

Die 10% Stocksolution besteht aus:

- 5 Beutel Tris/Glycine Buffer
- 2000 ml dH₂O

2.2.1.4 Zubereitung des Running-Buffers

Der Running-Buffer besteht aus:

- 200 ml 10x Tris/Glycine Buffer (siehe unter *Stocksolution.*)
- 1800 ml dH₂O
- 20 ml 10% SDS

2.2.1.5 Zubereitung des Transfer-Buffers

Für 5 Liter Transfer-Buffer wird verwendet:

- 1 Liter Methanol
- 400 ml 10 % Stocksolution (siehe unter *Stocksolution.*)
- 2 Liter dH₂O

Dabei wird besonders auf die Vermischung danach geachtet.

2.2.1.6 Zubereitung der 10% Milch

Die 10 % Milch besteht aus:

- 10 g Milchpulver
- 100 ml PBS

Die Milch wird über Nacht bei 4 °C gerührt und am folgenden Tag 10 min bei 5000 RPM zentrifugiert. Dabei ist darauf geachtet worden, dass der Bodensatz der zentrifugierten Milch verworfen wird.

2.2.1.7 Zubereitung der Antikörper

Primärer MUC5AC-Antikörper:

- 300 µl Antikörper LUM5B-2-WFU Rabbit # G226; Lot:30756
- 300 µl Natriumazid
- 30 ml 1% PBS-Milch (3 ml 10% Milch + 27 ml PBS)

Primärer MUC5B-Antikörper:

- 600 µl Antikörper LUM5-1-WFU Rabbit # G224; Lot:30755
- 300 µl Natriumazid
- 30 ml 1% PBS-Milch (3 ml 10% Milch + 27 ml PBS)

Sekundärer Antikörper:

- 24 µl sekundärer Antikörper: HRP goat-anti rabbit antibody
- 30 ml 1 % PBS-Milch

2.2.1.7.1 Details der primären Antikörper

Die für die Western-Blot-Analyse verwendeten Antikörper wurden von Dr. Markus Henke im Labor von Prof. Bruce K. Rubin an der Wake Forest University School of Medicine in Winston-Salem, North Carolina, USA, auf Spezifität geprüft. Es wurden Kaninchen mit Peptiden mit den Sequenzen RNQDQQGPFKMC (gekennzeichnet: LUM5-1-WFU; ebenfalls verwendet von^{35, 93, 95}), die im C-terminalen Anteil und in zwei Teilen nahe der Tandem-Wiederholungs-Sequenz des MUC5AC-Apoproteins zu finden ist, und RNREQVGKFKMC, die in der Cystein-reichen Domäne der Wiederholungssequenzen im zentralen Exon des MUC5B-Apoproteins (gekennzeichnet: LUM5B-2-WFU; ebenfalls verwendet von¹⁰⁵) liegt, immunisiert. Die Antiseren, die nach 4 Wochen gewonnen werden konnten, wurden mittels ELISA für Peptide und mittels Western Blot für Proteine auf Spezifität überprüft. Um die Spezifität zu erhöhen und die unspezifische Bindung zu minimieren, wurden die Seren mit dem SulfoLink Kit (Pierce) gereinigt.

2.2.1.8 Gelelektrophorese

Die zwei fest gewordenen Gele werden im Running-Buffer in der Box eingebettet. Die erhitzten und denaturierten 12 Proben werden jeweils zu 50µl in die Geltaschen pipettiert und schließlich wird jeweils zusätzlich an 13. Stelle des Gels der Marker (Kaleidoskope® Prestained Standards) gesetzt. Um die CF-Proben in Verhältnis setzen zu können wurde an letzter Stelle des Gels der interne Standard hinzugenommen, gegen den jede Probe verglichen wurde. Die Elektrophorese wird an einem horizontalen Gelapparat bei konstanten 100 Volt und Raumtemperatur vollzogen und wurde erst dann gestoppt, wenn die Proben das letzte hintere Drittel des Gels erreicht haben. Dem liegt zugrunde, dass so noch die kleinen Proteine identifiziert werden können.

Nach der Elektrophorese werden die Gele auf eine Nitrozellulose-Membran (12x15 cm) gelegt, die Luftblasen werden mittels eines Rollers herausgeschoben und letztendlich zwischen jeweils einer Schicht Vlies und Schwamm in einem Rahmen der Transferbox eingeklemmt. Diese 2 Plastikrahmen werden mit Transfer-Buffer in der Transferbox aufgefüllt und eingebettet und bei konstanten 30 Volt für min. 18 Stunden bei 4°C transferiert. Nach dem Transfer werden die Taschen des Gels auf die Membran seitlich mit einer Nadelspitze markiert, mit Datum und Identifikationsnummer gekennzeichnet und mit der 10% zentrifugierten Milch für 1 Stunde bei ständiger Bewegung benetzt.

Nach dieser ersten Stunde werden die zwei Membranen aus der Milch genommen und eine Stunde mit dem jeweiligen primären Antikörper benetzt. Eine Membran mit dem Antikörper gegen MUC5AC, die andere Membran mit dem Antikörper gegen MUC5B. Nach der einstündigen Benetzung des 1. Antikörpers, werden die Membranen 3x à 10 min. mit PBS gewaschen und schließlich zusammen mit dem 2. Antikörper (gekennzeichnet: HRP goat-anti rabbit-antibody in 1% PBS-Milch) für eine weitere Stunde benetzt. Danach werden die Membranen nochmals 3x à 10 min. in PBS gewaschen und schließlich mittels Picco-/Femto-Developer-Kit (Pierce) in identischen Zeitintervallen in einem Photolabor entwickelt (siehe Abbildung 3a und 3b). Der Femto-Entwickler diente durch seine Sensitivität zum ergänzenden Nachweis kleinster Fragmente auf den Blot-Membranen.

2.2.1.9 Auswertung

Die gewonnenen Fotos der Blots wurden identifizierbar beschriftet und zur Auswertung in einen Computer eingescannt. Mittels Canon Scan® Software und Scion Image® Software wurden die Blots analysiert. Dafür wurde jede Bande der CF-/ und ETT-Proben mit der Bande des Standards verglichen und mathematisch in Verhältnis gesetzt. Die semiquantitative Messung wurde durchgeführt, indem ein ausgewählter Dichtebereich einer Bande (CF-/ und ETT-Proben) mit dem Dichtebereich des Standards (=100%) rechnerisch verglichen wurde (Abb. 3a und 3 b).

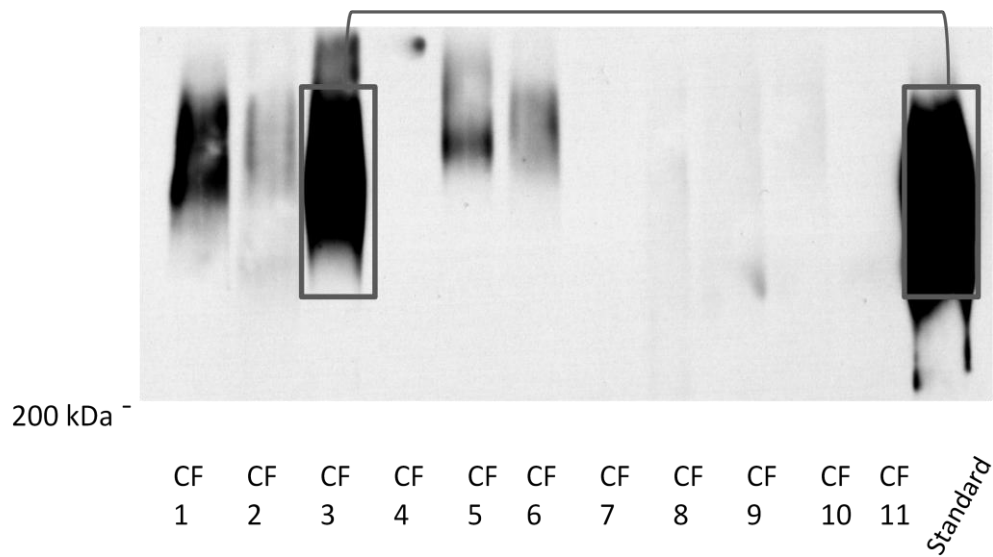


Abbildung 3 a

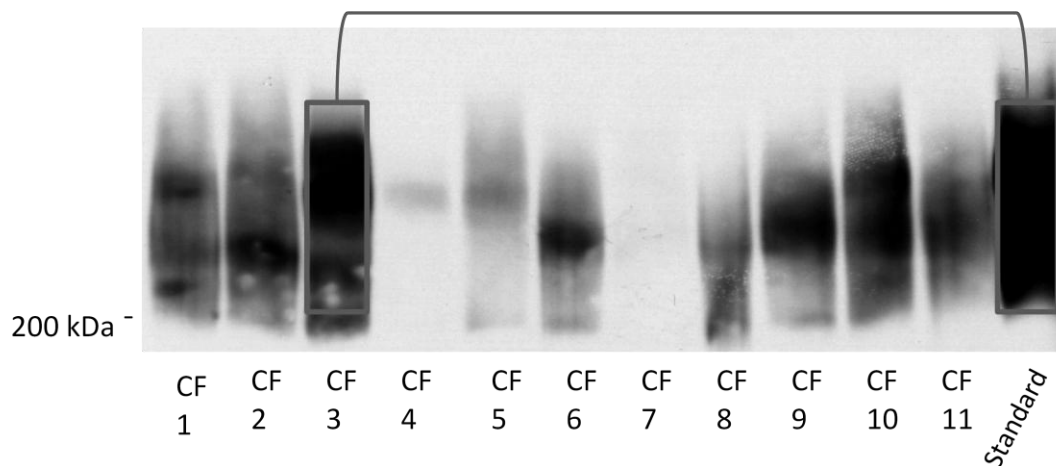


Abbildung 3 b

Abbildung 3a und 3b: Ein Beispiel für ein Western Blot-Ergebnis (#188 MUC5AC und MUC5B). Gezeigt werden die Proteinbanden unterschiedlicher CF-Sputenproben. Rechts außen befindet sich die Proteinbande des internen Standards und links daneben 11 unterschiedliche CF-Proteinbanden. Jede Probe der CF-Gruppe und ETT-Gruppe wurde gegen diesen internen Standard (=100%) rechnerisch normiert. Dazu wurde ein identisch großer Dichtebereich einer Bande mittels Scion Image® 4.0.2. mit dem internen Standard verrechnet (graue Einrahmung).

2.2.2 DNS Analyse

Die DNS der einzelnen Sputen-Proben wurde mittels Mikrofluorometrie (Polarstar®) gemessen und ausgewertet (Fluostar® Galaxy)⁴⁰. Die Fluoreszenz ist bei einer angeregten Wellenlänge von 355 nm und Emission 450 nm gemessen worden. Als Fluorochrom wurde 33258 Höchst-Lösung benutzt und als Standard DNS-Lösung vom Kalbsthymus^{13, 14}. Die DNS-Konzentration der CF-/und ETT-Proben wird rechnerisch mit dem DNS-Standard (0.156-10.0 µg/ml) verglichen. Mit der DNS-Lösung des Standards wurde zunächst eine Konzentrationsreihe von 0,156–10 µg/ml hergestellt.

2.2.2.1 Ansetzen der 20 %SSC (Standard-Saline-Citrate) -Lösung

- 17.532 g 0.0154 M NaCl-
- 8.823 g 0.015 M Na³-citrat, mit HCl auf pH 7.0 titriert

2.2.2.2 Ansetzen einer Hoechst-Lösung

- 100 ml 1% SSC
- 10 µl Hoechst-Stammlösung (250 mg Hoechst 33258 + 250 ml dH₂O)

2.2.2.3 Ansetzen einer DNS-Standardlösung

- 100 µl DNS-Stammlösung Kalbsthymus DNS (10 mg DNS in 10 ml PBS)
- 10 ml 1% SSC

2.2.2.4 Messung

Es wurde auf einer weißen 96-Wells (Greiner) Platte jeweils 200µl Hoechst-Lösung/Well pipettiert. Von der Standard-Konzentrationsreihe wurde jeweils 10 µl zwei Mal nebeneinander in jeweils ein Well (zu den 200µl Hoechst-Lösung) pipettiert.

Dann wurde von den 1:50 verdünnten CF-Proben und 1:10 verdünnten ETT-Proben der Reihe nach 10µl entnommen und ebenfalls in die Hoechst-Lösung zwei Mal nebeneinander pipettiert.

2.2.2.5 Auswertung

Die einzelnen Sputen-Proben werden mittels Fluorstar® ausgewertet.

Es wurden mindestens 3 Messungen an unterschiedlichen Tagen, aber unter identischen Versuchsbedingungen, für jede Probe durchgeführt und der Mittelwert [mg/ml] als finales Ergebnis verwendet.

2.2.3 Statistik

Die statistische Auswertung für die semiquantitative Konzentration der Muzine und der absoluten Konzentration der DNS wurde mittels SPSS11.5 für Windows (SAS Institut, Cary, NC) durchgeführt.

Um die Muzinkonzentration der einzelnen CF-Proben im Verlauf „klinisch stabil“ und „pulmonal exazerbiert“ zu vergleichen, wurde der t-Test für paarige parametrische Daten und der Wilcoxon-Test für paarige unparametrische Daten genommen. Um die Muzinkonzentration der einzelnen CF-Proben im Verlauf „klinisch stabil“ und „pulmonal exazerbiert“ mit denen gesunder Patienten (ETT) vergleichen zu können, wurde der Mann-Whitney-U-Test für unpaarige unparametrische Daten verwendet. Die graphischen Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler angezeigt. Als statistisch signifikant wird $p < 0,05$ gewertet.

3 Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die relativen Muzinkonzentrationen MUC5AC und MUC5B semiquantitativ im Sputum von gepaarten CF-Patienten (n=11) während einer klinisch stabilen Situation und während einer bronchopulmonalen Exazerbation verglichen. Als Kontrolle diente Mukus von gesunden Kontrollprobanden (n=11).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die absolute DNS-Konzentration [mg/ml] aus dem Sputum der gepaarten CF-Patienten (n=11) während einer klinisch stabilen Situation und während einer bronchopulmonalen Exazerbation verglichen. Als Kontrolle diente Mukus von gesunden Kontrollprobanden (n=11).

3.1 Resultate der Western Blot-Messung

In Sputa von 11 CF-Probanden zeigte sich im Vergleich zum internen Standard (=100%) eine durchschnittliche relative Konzentration von MUC5AC während einer stabilen Situation von 10 %. Während einer bronchopulmonalen Exazerbation zeigte sich eine durchschnittliche relative Konzentration (MUC5AC) von 100,9 % (siehe Abbildung 4). In Sputa von 11 CF-Probanden zeigte sich im Vergleich zum internen Standard (=100%) eine durchschnittliche relative Konzentration von MUC5B während der stabilen Situation von 52,6 %. Während einer bronchopulmonalen Exazerbation zeigte sich eine relative Konzentration (MUC5B) von 83,6% (siehe Abbildung 5). Der Unterschied des Muzingehalts der gepaarten CF-Sputa in einer klinisch stabilen Situation und bronchopulmonaler Exazerbation war für beide Muzine (MUC5AC und MUC5B) signifikant (Wilcoxon-Test $p < 0,05$).

Im Mukus von 11 ETT-Kontrollprobanden zeigte sich im Vergleich zum internen Standard eine relative Konzentration von 88,7 % für MUC5AC und von 87,6% für MUC5B (Abbildung 6). Es zeigt sich ein signifikant niedriger Gehalt an MUC5AC und MUC5B während der klinisch stabilen Phase der CF-Patienten verglichen mit der ETT-Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,05$). Während einer bronchopulmonalen Exazerbation zeigen sich ähnlich hohe relative Konzentrationen der Muzine MUC5AC und MUC5B im Vergleich zu den ETT-Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test $p = \text{nicht signifikant}$).

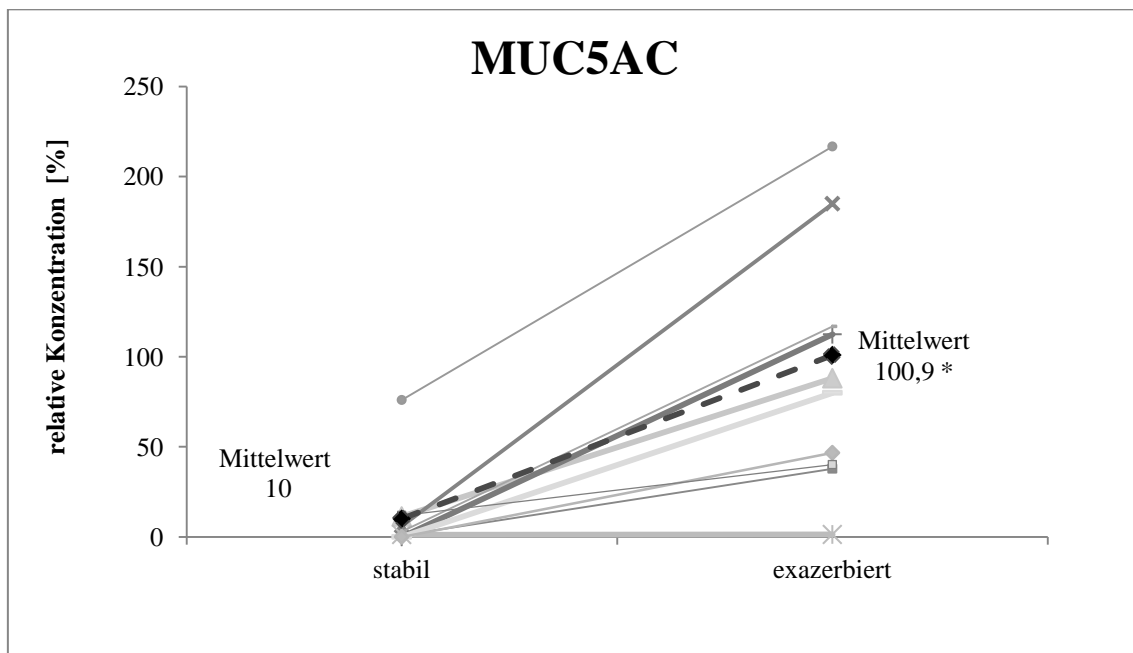


Abbildung 4: Graphisch dargestellte Ergebnisse der Western Blot-Messung von MUC5AC der CF-Proben im klinischen Verlauf. Analyse des Sputums von 11 CF Patienten gepaart während einer klinisch stabilen Phase und während einer bronchopulmonalen Exazerbation mit spezifischen MUC5AC-/MUC5B-Antikörpern. Die relative Konzentration wurde anhand eines internen Standards (=100%) rechnerisch ermittelt. Der Mittelwert [%] aus den Messungen ist durch die schwarz gestrichelte Linie und den Werten unterhalb davon, gekennzeichnet. MUC5AC und MUC5B lassen sich durch Aviditätsunterschiede der Antikörper nicht direkt untereinander vergleichen. *Der Anstieg des Muzins MUC5AC während einer bronchopulmonalen Exazerbation ist statistisch signifikant zur klinisch stabilen Situation (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$).

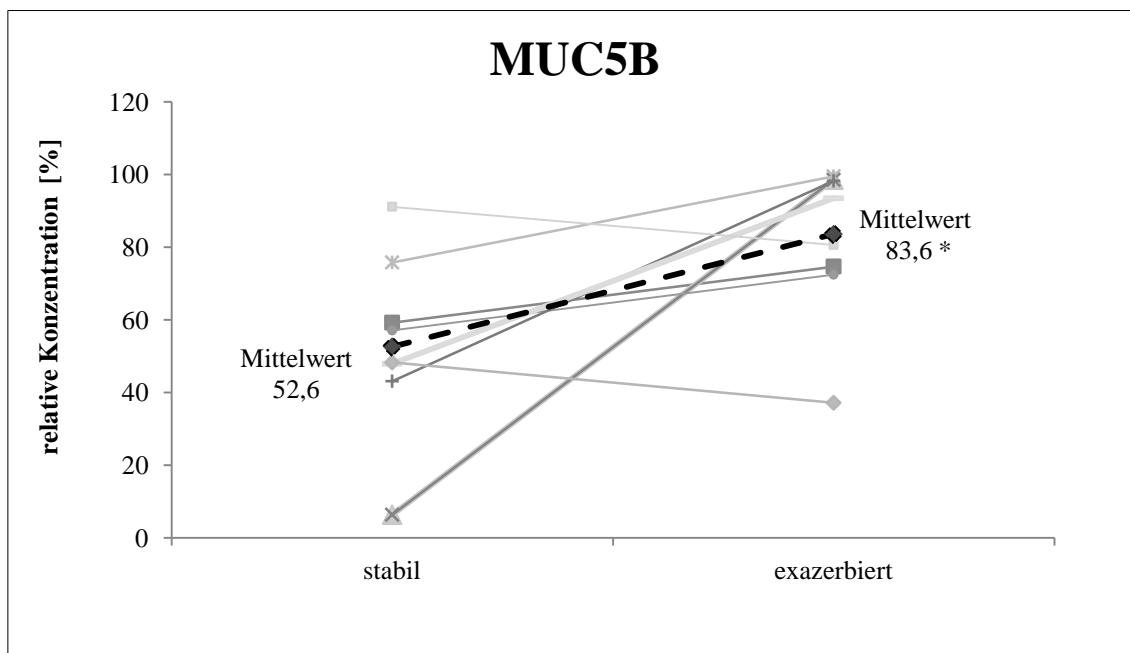


Abbildung 5: Graphisch dargestellte Ergebnisse der Western Blot-Messung von MUC5B der CF-Proben im klinischen Verlauf. Analyse des Sputums von 11 CF Patienten gepaart während einer klinisch stabilen Phase und während einer bronchopulmonalen Exazerbation mit spezifischen MUC5AC-/ MUC5B-Antikörpern. Die relative Konzentration wurde anhand eines internen Standards (=100%) rechnerisch ermittelt. Der Mittelwert [%] aus den Messungen ist durch die schwarz gestrichelte Linie und den Werten unterhalb davon, gekennzeichnet. MUC5AC und MUC5B lassen sich durch Aviditätsunterschiede der Antikörper nicht direkt untereinander vergleichen. *Der Anstieg des Muzins MUC5B während einer bronchopulmonalen Exazerbation ist statistisch signifikant zur klinisch stabilen Situation (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$).

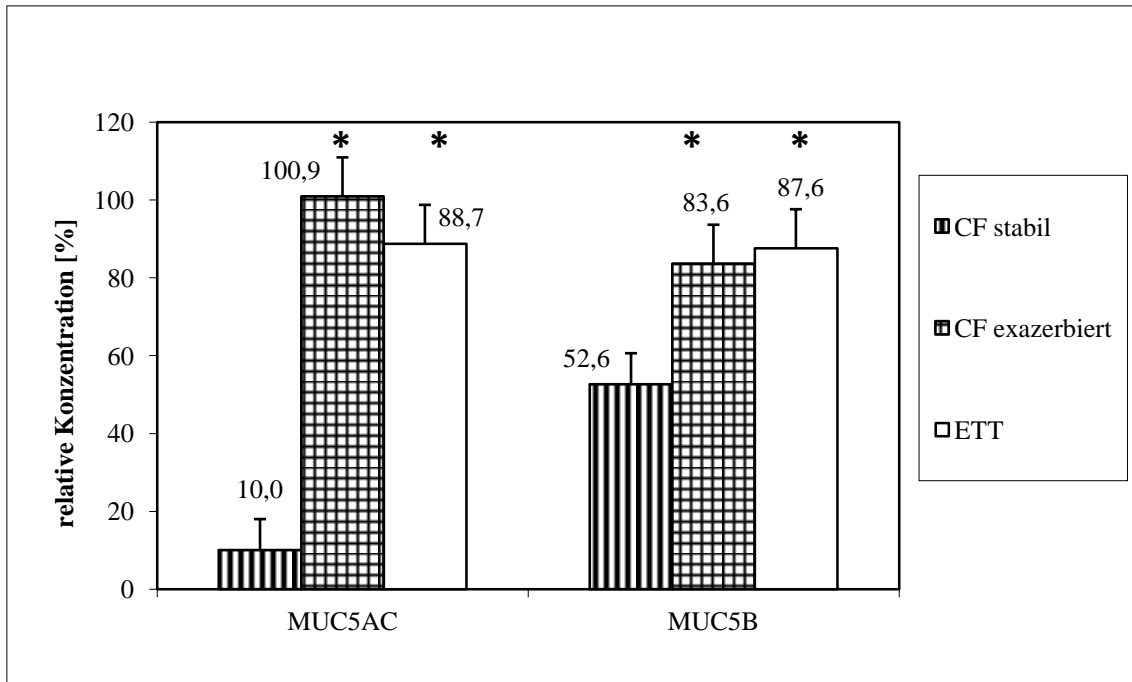


Abbildung 6: Graphisch dargestellte Ergebnisse der Western Blot-Messung von MUC5AC und MUC5B der CF-Proben im klinischen Verlauf (senkrechte Streifen: in klinisch stabiler Situation; kariert: während bronchopulmonaler Exazerbation) verglichen mit 11 ETT-Kontrollproben. Analyse des Sputums von 11 CF Patienten gepaart während einer klinisch stabilen Phase und während einer bronchopulmonalen Exazerbation und 11 ETT-Kontrollen mit spezifischen MUC5AC-/MUC5B-Antikörpern. Die relative Konzentration wurde anhand eines internen Standards (=100%) rechnerisch ermittelt. Der Mittelwert [%] aus den Messungen ist oberhalb der Balken gekennzeichnet. MUC5AC und MUC5B lassen sich durch Aviditätsunterschiede der Antikörper nicht direkt untereinander vergleichen. *Der Anstieg der Muzine MUC5AC und MUC5B bei CF-Probanden ist in der bronchopulmonalen Exazerbation statistisch signifikant höher zum klinisch stabilen Zustand (Wilcoxon-Test, beide $p < 0,05$). Weiterhin sind die Muzine MUC5AC und MUC5B signifikant höher in der ETT-Kontrolle verglichen zum klinisch stabilen Zustand der CF-Probanden (Mann-Whitney-U-Test, beide $p < 0,05$).

3.2 Resultate der DNS-Messung

Die durchschnittliche DNS-Konzentration (Abbildung 7) der gepaarten 11 CF-Proben betrug im klinisch stabilen Zustand 6,7 mg/ml und in der bronchopulmonalen Exazerbation 5,2 mg/ml. Der Unterschied war nicht signifikant (Wilcoxon-Test, $p =$ nicht signifikant).

Die durchschnittliche DNS-Konzentration der ETT-Kontrollen betrug im Mittel 0,96 mg/ml. Es zeigt sich eine signifikant höhere DNS-Konzentration sowohl in der klinisch stabilen Phase als auch während der bronchopulmonalen Exazerbation der CF-Proben im Vergleich zu den ETT-Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test beide $p < 0,05$).

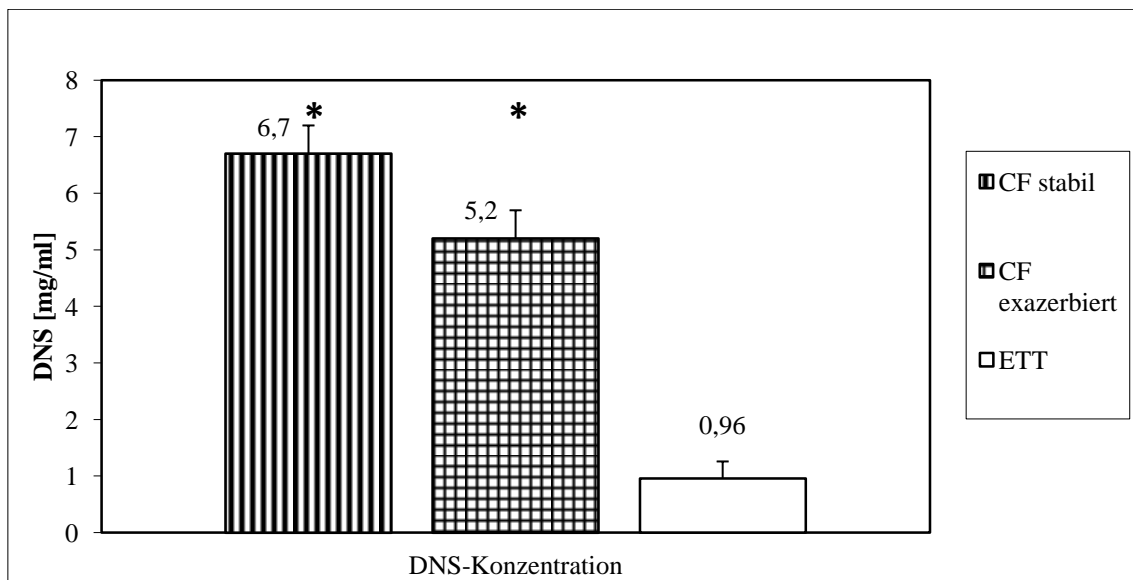


Abbildung 7: Graphisch dargestellte Ergebnisse der DNS-Konzentration von 11 CF-Proben (senkrechte Streifen: in klinisch stabiler Situation; kariert: während bronchopulmonaler Exazerbation) und von 11 ETT-Proben. Das Diagramm zeigt die DNS-Konzentrationen in mg/ml. Die Mittelwerte befinden sich oberhalb der Balken. *Die DNS-Konzentration ist in der klinisch stabilen Situation und während der bronchopulmonalen Exazerbation im Vergleich zur ETT-Kontrolle signifikant höher (Mann-Whitney-U-Test, beide $p < 0,05$).

4 Diskussion

Hauptursächlich für das bis heute begrenzte Leben von Mukoviszidose-Erkrankten, ist die progrediente respiratorische Insuffizienz. Durch das Auftreten von bronchopulmonalen Exazerbationen kommt es zu einer progressiven pulmonalen Verschlechterung und einer Abnahme des Gesundheitszustands des Patienten. Aggraviert wird dies durch eine Beeinträchtigung des immunologischen Gleichgewichts¹⁰⁶. Nach einiger Zeit werden die Atemwege durch pathogene Keime chronisch besiedelt und ein zähes Sputum obstruiert die Bronchien. Bislang geht man davon aus, dass analog zum Mukus der gesunden Atemwege, auch bei CF im Sputum die Muzine den wesentlichen Bestandteil ausmachen. Diese Muzine werden durch ihre komplexe Struktur und ihre Masse für die Viskosität des respiratorischen Sekrets verantwortlich gemacht^{96;75}.

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass im Vergleich zu Gesunden die Muzine MUC5AC und MUC5B in der klinisch stabilen Situation signifikant erniedrigt sind. Dies ist eine Bestätigung der bereits von Henke et al.³² publizierten Daten. Damals wurde postuliert, dass die verminderte Muzinkonzentration in Zusammenhang mit dem CFTR-Defekt stehen könnte und es somit zu einer verminderten Muzinproduktion oder inadäquaten Muzinsekretion kommt. In der vorliegenden Arbeit konnten wir semiquantitativ zeigen, dass die Muzine MUC5AC und MUC5B in einer bronchopulmonalen Exazerbation signifikant ansteigen. Dies wurde ebenfalls von Voynow und Kollegen¹⁰¹ beobachtet. Entzündungsmediatoren können insgesamt zu einer vermehrten MUC5AC-Expression führen¹⁰². Somit ist die Verminderung der Muzine vermutlich nicht durch einen genetischen Defekt bedingt, sondern wie neuere Studien zeigen, durch verstärkte Proteasenaktivität verursacht³⁰. Es wäre vorstellbar, dass eine Verminderung der Muzine möglicherweise die Infektanfälligkeit begünstigt. In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass bei einer chronischen Kolonisation mit *P. aeruginosa* die Muzine deutlich erniedrigt waren im Vergleich mit ETT und dass bei fehlender bronchopulmonaler Besiedelung mit diesem Keim die Muzine MUC5AC und MUC5B ähnlich hoch wie bei ETT waren. Da sämtliche unserer CF-Probanden chronisch mit *P. aeruginosa* pulmonal besiedelt waren, ist der verminderte Muzinnachweis durch diesen bakteriellen proteolytischen Abbau nachweislich

vermindert. Herauszufinden wird in Zukunft sein, ob diese Proteasen verstärkt in CF aktiv sind. Bedeutend ist allerdings die Fähigkeit des Lungenepithels in der Phase einer bronchopulmonalen Exazerbation die Muzine vermehrt zu sezernieren, so dass der Muzingehalt auf eine ähnlich hohe Konzentration wie in der Kontrollgruppe ETT ansteigt.

Ramphal und Kollegen⁶⁹ zeigten, dass *Pseudomonas aeruginosa* sich an Muzine bindet. Eine Verminderung dieser Bindungsmöglichkeit könnte vermutlich die bronchopulmonale Infektanfälligkeit der CF-Erkrankten zusätzlich verstärken. Wir sehen darin eine schützende Eigenschaft dieser Muzine. Vermutlich ist eine gewisse Muzinkonzentration in den Atemwegen notwendig, um Bakterien und virulente Komponenten adäquat abzuwehren. Möglicherweise ist durch eine verminderte Muzinkonzentration und damit fehlender Bindemöglichkeit für Bakterien in der klinisch stabilen Situation das Lungenparenchym chronisch mit Bakterien besiedelt. In der Gesamtschau kann sich diese protektive Wirkung der Muzine³¹ essentiell im Verständnis und der Therapie der Mukoviszidose auswirken.

Mögliche Fehlerquellen bei der Aufarbeitung der Proben liegen im Allgemeinen in der möglichen enzymatischen Spaltung der Muzine durch endogene Enzyme und in einer fortschreitenden proteolytische Fragmentierung. Diese Fehlerquellen konnten wir durch die Verwendung und direkte Zugabe von Proteinase-Inhibitoren nach Sputumgewinnung umgehen. Darüber hinaus konnten Henke et al. nachweisen, dass sich der Muzin-Gehalt bei aufgetauten Proben erst nach 3 Stunden ohne Protease-Inhibitoren halbiert und durch dessen Zugabe bis zu 6 Stunden keinen veränderten Effekt auf den Muzingehalt erwarten lässt. Bei der Verarbeitung der Proben wurden zudem Aliquots von den einzelnen Proben verwendet, die für ca. 1-2 experimentelle Untersuchungen ausreichen und somit das häufige Auftauen und Einfrieren überflüssig machten. Die mögliche Aktivierung von Enzymen wurde zusätzlich umgangen, indem ein striktes Zeitfenster eingehalten wurde, in dem die Proben maximal 40 min. bearbeitet werden durften. Eine weitere mögliche Fehlerquelle betrifft die Verwendung der (polyklonalen) Antikörper für jeweils MUC5AC und MUC5B. Durch eine mögliche enzymatische Spaltung der Epitope kann es zu einer Unterschätzung des tatsächlichen Muzin-Gehalts kommen. Hovenberg und Kollegen³⁵ benutzten einen identischen

Antikörper für MUC5AC und konnten durch experimentelle Spaltung der Muzine in Subeinheiten keinen Unterschied in der Antikörperbindung feststellen.

In dieser Arbeit zeigte sich weiterhin, dass das Polymer DNS signifikant höher in CF-Sputa vorliegt als in ETT-Sputa. Ähnliche DNS-Werte, (3-14 mg/ml), konnten von anderen Studien bestätigt und gezeigt werden^{16, 64, 67}. Der Grund für einen Unterschied im DNS-Gehalt zwischen CF-Patienten und ETT liegt wahrscheinlich im Untergang von Entzündungszellen, die bei den chronisch-infizierten CF-Patienten, vor allem mit *Pseudomonas aeruginosa*, dominieren^{6, 55, 66}. Der Untergang dieser Entzündungszellen führt in CF-Patienten zu einem höheren DNS-Nachweis. Diese Ergebnisse konnten durch Kirchner et al. bestätigt werden, die ebenfalls eine DNS-Erhöhung beobachteten⁴³. Ebenso konnten Kim et al.⁴¹ und Bush und Kollegen¹¹, die beide die selbe Methodik wie wir benutzten, ähnliche Ergebnisse nachweisen.

Es konnte kein signifikanter Anstieg der absoluten DNS-Konzentration im klinisch stabilen Zustand zum pulmonal exazerbierten Zustand der CF-Patienten festgestellt werden. Durch die chronische Entzündung bei der Cystischen Fibrose ist das Lungenparenchym offenbar nicht in der Lage zusätzliche Entzündungszellen/-mediatoren zu mobilisieren. Diese Vermutung konnte durch Kim und Kollegen bestätigt werden, die keine signifikante Erhöhung von IL-8 und neutrophilen Granulozyten in einer Exazerbation feststellen konnten⁴¹. Das einzige nachweisbar-effektive Medikament, das die Viskosität des Sputums reduziert^{24, 33, 90} und das Abhusten des Sputums vereinfacht^{27, 70} ist die inhalativ-verabreichte RhDNase (Dornase alpha; Pulmozym®). Durch deren Anwendung kann es zu einer Unterschätzung der DNS-Konzentration kommen. Um diese Fehlerquelle zu vermeiden, wurde in unserer Studie Dornase alpha 24 Stunden vor Sputumentnahme pausiert.

4.1 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass das Sputum von CF-Patienten aus einem hohen Anteil DNS besteht, innerhalb einer Exazerbation allerdings die DNS-Konzentration nicht signifikant höher nachzuweisen war. Desweiteren sind die Muzine MUC5AC und MUC5B in einer stabilen Situation signifikant niedriger in CF-Sputa im Vergleich mit

Mucus von Gesunden nachzuweisen und steigen in einer Phase der pulmonalen Exazerbation auf ein signifikant höheres Niveau an, so dass sie ähnlich hohe relative Konzentrationen wie im Mucus Gesunder erreichen. Wir sehen darin die schützende Funktion der Muzine MUC5AC und MUC5B. Wir vermuten, dass durch diese Verminderung der Muzine es dem zunächst stabilen bronchopulmonalen System misslingt pathogene Keime oder andere destruktive Fragmente zu binden und zu einer chronischen Dauerentzündung des Lungenparenchyms mit rezidivierenden pulmonalen Exazerbationen führt, worunter der Muzingehalt gesteigert werden kann. Diese Erkenntnisse können helfen, die Pathophysiologie der Cystischen Fibrose besser zu verstehen und zukünftige therapeutische Konsequenzen zu ziehen.

5 Quellenverzeichnis

Internetquellen

[a]

Human Genetics Programme World Health Organization
WHO/HGN/CF/WG/04.02

The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis

http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_HGN_CF_WG_04.02.pdf, S. 4 und 15

(zuletzt abgerufen am 09.01.2012)

[b]

<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>

(zuletzt abgerufen am 09.01.2012)

[c]

Human Genetics Programme World Health Organization
WHO/HGN/CF/WG/04.02

The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis

www.who.int/genomics/publications/en/HGN_WB_04.02_fig2.pdf

(zuletzt abgerufen am 09.01.2012)

[d]

Inka Brockhausen, Harry Schachter, and Pamela Stanley

Essentials of Glycobiology. 2nd edition.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors.

Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

[www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch9&rendertype=Figure
&id=ch9.f1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch9&rendertype=Figure&id=ch9.f1)

(zuletzt abgerufen am 06.01.2012)

Literaturquellen

1. Adler KB, Li Y. Airway Epithelium and Mucus. Intracellular signaling pathways for gene expression and secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25(4):397-400.
2. Aitken ML, Fiel SB. Cystic fibrosis. *Dis Mon* 1993;39(1):1-52.
3. Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert D, Al-Awqati Q. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 1991;352(6330):70-73.
4. Basbaum C, Lemjabbar H, Longphre M, Li D, Gensch E, McNamara N. Control of mucin transcription by diverse injury-induced signaling pathways. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 2):S44-S48.
5. Bear CE, Li CH, Kartner N et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 1992;68(4):809-818.
6. Boat TF, Cheng PW, Iyer RN, Carlson DM, Polony I. Human respiratory tract secretion. Mucous glycoproteins of nonpurulent tracheobronchial secretions, and sputum of patients with bronchitis and cystic fibrosis. *Arch Biochem Biophys* 1976;177(1):95-104.
7. Borchers MT, Carty MP, Leikauf GD. Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators. *Am J Physiol* 1999;276(4 Pt 1):L549-L555.
8. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 2004;23(1):146-158.
9. Bronsveld I, Bijman J, Mekus F, Ballmann M, Veeze HJ, Tummler B. Clinical presentation of exclusive cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 1999;54(3):278-281.
10. Buisine MP, Devisme L, Copin MC et al. Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:209-218.
11. Bush A, Payne D, Pike S, Jenkins G, Henke MO, Rubin BK. Mucus properties in children with primary ciliary dyskinesia: comparison with cystic fibrosis. *Chest* 2006;129(1):118-123.
12. Carlstedt I, Sheehan JK, Corfield AP, Gallagher JT. Mucous glycoproteins: a gel of a problem. *Essays Biochem* 1985;20:40-76.

13. Cesarone CF, Bolognesi C, Santi L. Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal Biochem* 1979;100(1):188-197.
14. Cesarone CF, Bolognesi C, Santi L. [Fluorometric DNA assay at nanogram levels in biological material]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1980;56(16):1666-1672.
15. Cheng PW, Boat TF, Cranfill K, Yankaskas JR, Boucher RC. Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1989;84(1):68-72.
16. Chernick WS, Barbero GJ. Composition of tracheobronchial secretions in cystic fibrosis of the pancreas and bronchiectasis. *Pediatrics* 1959;24:739-745.
17. Chow CW, Landau LI, Taussig LM. Bronchial mucous glands in the newborn with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 1982;139(4):240-243.
18. Cohn L. Mucus in chronic airway diseases: sorting out the sticky details. *J Clin Invest* 2006;116(2):306-308.
19. Davies JR, Svitacheva N, Lannefors L, Kornfalt R, Carlstedt I. Identification of MUC5B, MUC5AC and small amounts of MUC2 mucins in cystic fibrosis airway secretions. *Biochem J* 1999;344(Pt 2):321-330.
20. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(5):475-482.
21. Dekker J, Rossen JW, Buller HA, Einerhand AW. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci* 2002;27(3):126-131.
22. Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA et al. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet* 1992;2(3):240-248.
23. Forstner G. Signal transduction, packaging and secretion of mucins. *Annu Rev Physiol* 1995;57:585-605.
24. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* 1994;331:637-642.
25. Gan KH, Geus WP, Bakker W, Lamers CB, Heijerman HG. Genetic and clinical features of patients with cystic fibrosis diagnosed after the age of 16 years. *Thorax* 1995;50(12):1301-1304.
26. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(8):918-951.

27. Griesse M, App EM, Duroux A, Burkert A, Schams A. Recombinant human DNase (rhDNase) influences phospholipid composition, surface activity, rheology and consecutively clearance indices of cystic fibrosis sputum. *Pulm Pharmacol Ther* 1997;10(1):21-27.
28. Groneberg DA, Peiser C, Dinh QT et al. Distribution of respiratory mucin proteins in human nasal mucosa. *Laryngoscope* 2003;113(3):520-524.
29. Henke MO, John G, Germann M, Lindemann H, Rubin BK. MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(8):816-821.
30. Henke MO, John G, Rheineck C, Chillappagari S, Naehrlich L, Rubin BK. Serine proteases degrade airway mucins in cystic fibrosis. *Infect Immun* 2011;79(8):3438-3444.
31. Henke MO, Ratjen F. Mucolytics in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2007;8(1):24-29.
32. Henke MO, Renner A, Huber RM, Seeds MC, Rubin BK. MUC5AC and MUC5B Mucins Are Decreased in Cystic Fibrosis Airway Secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31(1):86-91.
33. Hodson ME, Shah PL. DNase trials in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1995;8:1786-1791.
34. Holma B, Hegg PO. pH- and protein-dependent buffer capacity and viscosity of respiratory mucus. Their interrelationships and influence on health. *Sci Total Environ* 1989;84:71-82.
35. Hovenberg HW, Davies JR, Carlstedt I. Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem J* 1996;318 (Pt 1):319-324.
36. John G, Yildirim AO, Rubin BK, Gruenert DC, Henke MO. Toll-like Receptor (TLR)-4 Mediated Innate Immunity is Reduced in Cystic Fibrosis Airway Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009.
37. Joseph T, Look D, Ferkol T. NF-kappaB activation and sustained IL-8 gene expression in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelial cells stimulated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288(3):L471-L479.
38. Kaliner M, Shelhamer JH, Borson B, Nadel J, Patow C, Marom Z. Human respiratory mucus. *Am Rev Respir Dis* 1986;134(3):612-621.
39. Kerem E. Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy. *Pediatr Pulmonol* 2005;40(3):183-196.

40. Kim JS, Hackley GH, Okamoto K, Rubin BK. Sputum processing for evaluation of inflammatory mediators. *Pediatr Pulmonol* 2001;32(2):152-158.
41. Kim JS, Okamoto K, Rubin BK. Pulmonary function is negatively correlated with sputum inflammatory markers and cough clearability in subjects with cystic fibrosis. *Chest* 2006;129(5):1148-1154.
42. Kim WD. Lung mucus: a clinician's view. *Eur Respir J* 1997;10(8):1914-1917.
43. Kirchner KK, Wagener JS, Khan TZ, Copenhaver SC, Accurso FJ. Increased DNA levels in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(5):1426-1429.
44. Kirkham S, Sheehan JK, Knight D, Richardson PS, Thornton DJ. Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem J* 2002;361(Pt 3):537-546.
45. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 2002;109(5):571-577.
46. Kohri K, Ueki IF, Nadel JA. Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(3):L531-L540.
47. Konstan MW, Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:137-142.
48. Kopelman H, Corey M, Gaskin K, Durie P, Weizman Z, Forstner G. Impaired chloride secretion, as well as bicarbonate secretion, underlies the fluid secretory defect in the cystic fibrosis pancreas. *Gastroenterology* 1988;95(2):349-355.
49. Kristidis P, Bozon D, Corey M et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1992;50(6):1178-1184.
50. Kunzelmann K, Kathofer S, Greger R. Na⁺ and Cl⁻ conductances in airway epithelial cells: increased Na⁺ conductance in cystic fibrosis. *Pflügers Arch* 1995;431(1):1-9.
51. Lamblin G, Degroote S, Perini JM et al. Human airway mucin glycosylation: a combinatory of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis. *Glycoconj J* 2001;18(9):661-684.
52. Lamblin G, Lhermitte M, Klein A et al. The carbohydrate diversity of human respiratory mucins: a protection of the underlying mucosa? *Am Rev Respir Dis* 1991;144(3 Pt 2):S19-S24.
53. Leikauf GD, Borchers MT, Prows DR, Simpson LG. Mucin apoprotein expression in COPD. *Chest* 2002;121(5 Suppl):166S-182S.

54. Lemjabbar H, Basbaum C. Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to *Staphylococcus aureus* in epithelial cells. *Nat Med* 2002;8(1):41-46.
55. Lethem MI, James SL, Marriott C, Burke JF. The origin of DNA associated with mucus glycoproteins in cystic fibrosis sputum. *Eur Respir J* 1990;3(1):19-23.
56. Levine SJ, Larivee P, Logun C, Angus CW, Ognibene FP, Shelhamer JH. Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:196-204.
57. Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK et al. Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* 2004;23(2):282-293.
58. Li JD, Feng W, Gallup M et al. Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucin overproduction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5718-5723.
59. Mall M, Bleich M, Greger R, Schreiber R, Kunzelmann K. The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J Clin Invest* 1998;102(1):15-21.
60. Mall M, Bleich M, Kuehr J, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K. CFTR-mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 1):G709-G716.
61. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 2004;10(5):487-493.
62. Mall M, Wissner A, Gonska T et al. Inhibition of amiloride-sensitive epithelial Na(+) absorption by extracellular nucleotides in human normal and cystic fibrosis airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(6):755-761.
63. Matsui H, Grubb BR, Tarran R et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 1998;95(7):1005-1015.
64. Matthews LW, Spector S, Lemm J, Potter JL. Studies on pulmonary secretions. I. The overall chemical composition of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy. *Am Rev Respir Dis* 1963;88:199-204.

65. Millar-Jones L, Goodchild MC. Cystic fibrosis, pancreatic sufficiency and distal intestinal obstruction syndrome: a report of four cases. *Acta Paediatr* 1995;84(5):577-578.
66. Picot R, Das I, Reid L. Pus, deoxyribonucleic acid, and sputum viscosity. *Thorax* 1978;33(2):235-242.
67. Potter JL, Spector S, Matthews LW, Lemm J. Studies on pulmonary secretions. 3. The nucleic acids in whole pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy. *Am Rev Respir Dis* 1969;99(6):909-916.
68. Ramphal R, Arora SK. Recognition of mucin components by *Pseudomonas aeruginosa*. *Glycoconj J* 2001;18(9):709-713.
69. Ramphal R, Arora SK, Ritchings BW. Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(4 Pt 2):S170-S174.
70. Ratjen F, Paul K, van Koningsbruggen S, Breitenstein S, Rietschel E, Nikolaizik W. DNA concentrations in BAL fluid of cystic fibrosis patients with early lung disease: Influence of treatment with dornase alpha. *Pediatr Pulmonol* 2005;39(1):1-4.
71. Riordan JR. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol* 1993;55:609-630.
72. Riordan JR. Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am J Hum Genet* 1999;64(6):1499-1504.
73. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245(4922):1066-1073.
74. Rose MC. Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases [see comments]. *Am J Physiol* 1992;263(4 Pt 1):L413-L429.
75. Rose MC, Lynn WS, Kaufman B. Resolution of the major components of human lung mucosal gel and their capabilities for reaggregation and gel formation. *Biochemistry* 1979;18(18):4030-4037.
76. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006;86(1):245-278.
77. Rosenfeld M, Emerson J, Williams-Warren J et al. Defining a pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *J Pediatr* 2001;139(3):359-365.
78. Rosenstein BJ, Zeitlin PL. Cystic fibrosis. *Lancet* 1998;351(9098):277-282.

79. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 2003;67(Pt 5):471-485.
80. Rubin BK, Finegan B, Ramirez O, King M. General anesthesia does not alter the viscoelastic or transport properties of human respiratory mucus. *Chest* 1990;98(1):101-104.
81. Rubin BK, King M. Mucus physiology and pathophysiology: Therapeutic aspects. In: Derenne JP, Similowski T, Whitelaw WA, editors. *Acute Respiratory Failure in Chronic Obstructive Lung Disease*. New York: Marcel Dekker; 1996:391-411.
82. Rubin BK, Ramirez O, Zayas JG, Finegan B, King M. Collection and analysis of respiratory mucus from subjects without lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(4 Pt 1):1040-1043.
83. Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* 2000;28(1):231-234.
84. Schulz BL, Sloane AJ, Robinson LJ et al. Mucin glycosylation changes in cystic fibrosis lung disease are not manifest in submucosal gland secretions. *Biochem J* 2005;387(Pt 3):911-919.
85. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(23):9188-9192.
86. Sheehan JK, Howard M, Richardson PS, Longwill T, Thornton DJ. Physical characterization of a low-charge glycoform of the MUC5B mucin comprising the gel-phase of an asthmatic respiratory mucous plug. *Biochem J* 1999;338 (Pt 2):507-513.
87. Sheehan JK, Thornton DJ, Somerville M, Carlstedt I. Mucin structure. The structure and heterogeneity of respiratory mucus glycoproteins. *Am Rev Respir Dis* 1991;144(3 Pt 2):S4-S9.
88. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 1999;79(1 Suppl):S23-S45.
89. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996;85(2):229-236.
90. Stocks J, Godfrey S, Beardsmore C, Bar-Yishay E, Castile R. Plethysmographic measurements of lung volume and airway resistance. ERS/ATS Task Force on Standards for Infant Respiratory Function Testing. European Respiratory Society/ American Thoracic Society. *Eur Respir J* 2001;17(2):302-312.

91. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 1995;269(5225):847-850.
92. Thiagarajah JR, Song Y, Haggie PM, Verkman AS. A small molecule CFTR inhibitor produces cystic fibrosis-like submucosal gland fluid secretions in normal airways. *FASEB J* 2004;18(7):875-877.
93. Thornton DJ, Carlstedt I, Howard M, Devine PL, Price MR, Sheehan JK. Respiratory mucins: identification of core proteins and glycoforms. *Biochem J* 1996;316 (Pt 3):967-975.
94. Thornton DJ, Davies JR, Carlstedt I, Sheehan JK. Structure and Biochemistry of human respiratory mucins. In: Rogers DF, Lethem MI, editors. *Airway mucus: basic mechanisms and clinical perspectives*. Basel, Switzerland: Birkhaeuser Publishing Limited; 1997:19-40.
95. Thornton DJ, Devine PL, Hanski C, Howard M, Sheehan JK. Identification of two major populations of mucins in respiratory secretions. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(3):823-832.
96. Thornton DJ, Sheehan JK, Lindgren H, Carlstedt I. Mucus glycoproteins from cystic fibrotic sputum. Macromolecular properties and structural 'architecture'. *Biochem J* 1991;276 (Pt 3):667-675.
97. Tizzano EF, Buchwald M. CFTR expression and organ damage in cystic fibrosis. *Ann Intern Med* 1995;123(4):305-308.
98. Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet* 1992;8(11):392-398.
99. Urquhart DS, Allen J, Elrayess M, Fidler K, Klein N, Jaffe A. Modifier effect of the Toll-like receptor 4 D299G polymorphism in children with cystic fibrosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006;54(4):271-276.
100. Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM et al. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(10):1036-1043.
101. Voynow JA, Gendler SJ, Rose MC. Regulation of mucin genes in chronic inflammatory airway diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34(6):661-665.
102. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 2009;135(2):505-512.
103. Voynow JA, Young LR, Wang Y, Horger T, Rose MC, Fischer BM. Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol* 1999;276(5 Pt 1):L835-L843.
104. Wang B, Lim DJ, Han J, Kim YS, Basbaum CB, Li JD. Novel cytoplasmic proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* up-regulate human MUC5AC

mucin transcription via a positive p38 mitogen-activated protein kinase pathway and a negative phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *J Biol Chem* 2002;277(2):949-957.

105. Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, Carlstedt I. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J* 1998;334 (Pt 3):685-693.
106. Wood RE, Leigh MW. What is a "pulmonary exacerbation" in cystic fibrosis? *J Pediatr* 1987;111(6 Pt 1):841-842.
107. Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem* 2001;276(29):27371-27375.
108. Zielenski J, Corey M, Rozmahel R et al. Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 1999;22(2):128-129.
109. Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995;29:777-807.

6 Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas bedanke ich mich bei Prof. C. Vogelmeier.

Für die gesamte Betreuung, die Geduld und Großzügigkeit möchte ich mich herzlichst bei Dr. Markus Henke bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Martin Ritter für seine technische Beratung, bei Bärbel Germann für die Verbesserungen und Anregungen und bei Yves Saydjari für seine seit fast 7 Jahren anhaltende Unterstützung und Begleitung. Folgende Personen hatten zwar keinen direkten Einfluss auf die Verfassung der Dissertation gehabt, sollten aber nicht unerwähnt bleiben:

Dr. Catherine Burgy

Siham Charki

Renate und Baldur Fauth

Fusun Genisova

Ingeborg und Helen Germann

Erika und Carsten Grepels

Janine Heckwolf

Nora Nele und Anna-Lisa Heinevetter

Anna Junge

Anne Meuer

Johanna Napierala

Ilona und Havaard Reppe

Charlotte und Christian Constantin Ritter

Hildegard und Dr. Herbert Ritter

Edyta und Samir Saydjari

Christine Scheffner

Daniel Sieveking

Desiree Stahl

7 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Adamkiewicz	Herrmann-Lingen	Oertel
Aumüller	Hoyer	Radsak
Basler	Jungclas	Remschmidt
Baum	Kill	Renz
Becker	Koolman	Richter
Boudriot	Kortus- Götze	Schäfer
Christiansen	Kuhlmann	Schmidt
Eilers	Krause	Schrader
Fuchs	Krieg	Schulte-Körne
Gerdes	Kroll	Seitz
Görg	Lang	Vogelmeier
Gotzen	Lenz	Wagner
Grimm	Lill	Weiler
Griss	Maier	Wennemuth
Grundmann	Maisch	Werner
Grzeschik	Mandrek	Westermann
Gudermann	Moll	Wulff
	Mueller	
	Mutters	
	Neubauer	
